

DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:	PCT/FR2019/051456
International filing date:	14 June 2019 (14.06.2019)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: FR
	Number: 1855239
	Filing date: 14 June 2018 (14.06.2018)
Date of receipt at the International Bureau:	18 July 2019 (18.07.2019)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)



Brevet d'invention

Certificat d'utilité

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Lille, le 04/07/2019

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Directeur de la Propriété Industrielle

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Philippe CADRE'.

Philippe CADRE



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITE

Réception électronique de la soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou d'un certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été automatiquement attribués.

Numéro de demande	1855239	
Numéro de soumission	1000467080	
Date de réception	14 juin 2018	
Vos références	B2771FR00	
Demandeur	LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES	
Pays	FR	
Titre de l'invention	Combinaison de Facteur VII et d'un anticorps bispécifique anti-Facteurs IX et X	
Documents envoyés	package-data.xml application-body.xml requetefr.pdf (3 p.) comment.pdf (1 p.) fr-office-specific-info.xml	requetefr.xml fr-fee-sheet.xml validation-log.xml indication-bio-deposit.xml textebrevet.pdf (28 p.)
Déposé par	EMAIL=contact@becker.fr,CN=Benedicte PIERRU,O=CABINET BECKER ET ASSOCIES,C=FR	
Méthode de dépôt	Dépôt électronique	
Date et heure de réception électronique	14 juin 2018, 17:00:34 (CEST)	
Empreinte officielle du dépôt	20:59:41:12:F1:9E:2E:77:C5:0A:98:23:30:7E:16:BB:F3:C9:12:A8	

/INPI, section dépôt/

15 rue des Minimes - CS 50001 - 92677 Courbevoie Cedex

INPI Direct : 0820 210 211 (Service 0,10 €/min + prix appel)

Pour déposer par télécopie : 33 (0)1 56 65 86 00

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

REMISE DES PIÈCES 14/06/2018 DATE 1855239 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Becker & Associés 25 Rue Louis le Grand 75002 PARIS FR	
Vos références pour ce dossier B2771FR00			
2 NATURE DE LA DEMANDE			
Nature	Brevet d'invention		
3 TITRE DE L'INVENTION			
Titre	Combinaison de Facteur VII et d'un anticorps bispécifique anti-Facteurs IX et X		
4 PRIORITÉ			
5-1 DEMANDEUR		Personne morale	
Nom	LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES		
Affaire suivie par			
Rue	3 Avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf		
Code postal et ville	91940 LES ULIS		
Pays	FR		
Nationalité	FR		
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
N° de téléphone			
N° de télécopie			
Courrier électronique			
6 MANDATAIRE			
Nom	Becker & Associés		
Qualité	Cabinet CPI : Marion Chajmowicz, pouvoir général : 21 869		

Rue	25 Rue Louis le Grand			
Code postal et ville	75002 PARIS			
Pays	FR			
N° de téléphone	01 53 43 85 00			
N° de télécopie	01 53 43 85 05			
Courrier électronique	contact@becker.fr			
7 RAPPORT DE RECHERCHE				
Type d'établissement	Établissement immédiat			
Type d'envoi	Envoi électronique à contact@becker.fr			
8 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES				
9 DÉPÔT DE MATIÈRE BIOLOGIQUE				
10 SÉQUENCES DE NUCLÉOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS				
11 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS	Fichier électronique	Détails		
Fichier corps du texte	textebrevet.pdf	page(s) 28, D 25, R 2, AB 1		
12 EXTENSION DE LA PROTECTION				
En cochant la case ci-après, le(s) demandeur(s) manifestent l'intention d'étendre les effets de la demande de brevet et du brevet délivré sur la base de cette demande au territoire indiqué avec lequel des accords d'extension sont en vigueur à la date du dépôt de la demande. ☐ Polynésie française				
13 MODE DE PAIEMENT				
Mode de paiement	Prélèvement du compte client			
Numéro du compte	2976			
14 REDEVANCES JOINTES	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt d'une demande électronique	EURO	26	1	26
063 Rapport de recherche	EURO	520	1	520
068 Revendication à partir de la 11ème	EURO	42	1	42
Total	EURO			588
15 ANNOTATION				
16 DATE ET SIGNATURE				
Signé numériquement par	Subject: FR, CABINET BECKER ET ASSOCIES, Benedicte PIERRU; Issuer: FR, INPI, INPI-EN-LIGNE 1.1			

Date	14 June 2018
Signataire	Mandataire

Conformément aux dispositions de la loi n° 78-17 du 6.01.1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI. Les données à caractère personnel que vous êtes tenu(e) de nous fournir dans ce formulaire sont exclusivement utilisées pour identifier le titulaire de la demande et son éventuel mandataire.

L'invention concerne des compositions pharmaceutiques utiles pour le traitement d'un désordre de la coagulation, comme l'hémophilie A, spécialement chez un patient présentant une hémophilie de type A avec développement d'anticorps inhibiteurs du facteur VIII.

5

Arrière-plan technologique

La coagulation met en jeu deux voies, l'une intrinsèque, l'autre extrinsèque, aboutissant à une voie finale commune. La combinaison des deux mécanismes assure la formation d'un caillot
10 de sang solide et flexible, qui résiste à la pression sanguine. Sous l'action de la thrombine, le fibrinogène subit des modifications chimiques qui aboutissent à la formation de la fibrine. La fibrine est nécessaire à la formation du caillot.

La voie intrinsèque comporte les facteurs présents dans la circulation et le processus de coagulation démarre au sein même du vaisseau sanguin. La voie extrinsèque quant à elle,
15 met en jeu les facteurs tissulaires non présents normalement dans la circulation et qui sont libérés lors d'une lésion vasculaire.

Le facteur VII est une glycoprotéine qui intervient dans la voie extrinsèque de la coagulation sanguine. Pour initier la cascade de coagulation, le FVII doit être activé en FVIIa. Une fois activé, le FVIIa se complexe au facteur tissulaire (FT), protéine associée à des phospholipides,
20 qui est libérée lors de la lésion vasculaire. Le FVIIa seul (non complexé au facteur tissulaire) présente une faible activité protéolytique. Le complexe FVIIa-FT transforme ensuite le facteur X en facteur Xa en présence d'ions calcium. Ce complexe agit également sur l'activation du facteur FIX en FIXa, catalysant ainsi la voie intrinsèque. Les facteurs IXa et Xa, activent en retour le facteur VII activé.

25 Le facteur IX et le facteur X interviennent dans la voie intrinsèque de la coagulation. Le facteur IX activé permet l'activation du facteur X en facteur Xa.

Le facteur Xa complexé au facteur FV activé et à la prothrombinase transforme la prothrombine en thrombine. La thrombine agit alors sur le fibrinogène pour le transformer en fibrine et permet également l'activation du FVIII et du FV en FVIIIa et FVa, respectivement. La thrombine, pour
30 sa part, permet d'activer le facteur XIII en FXIIIa, responsable de la consolidation du caillot de fibrine, en présence de calcium, naturellement présent dans le plasma.

Néanmoins, lorsqu'un facteur de la coagulation fait défaut, la cascade de coagulation est interrompue ou déficiente et on parle alors d'une coagulation anormale.

Le facteur VII activé agit localement en présence de facteur tissulaire libéré après une lésion
35 de tissus engendrant des hémorragies, même en l'absence de facteur VIII ou IX. C'est pourquoi le facteur VII, de préférence sous forme activée, est utilisé pour le traitement de certains troubles de la coagulation sanguine se manifestant par des saignements.

Le facteur VII est ainsi utilisé dans le traitement des patients atteints d'hémophilie, présentant un déficit en facteur VIII (hémophilie de type A) ou en facteur IX (hémophilie de type B), ainsi que des patients présentant d'autres déficiences des facteurs de coagulation, par exemple un déficit héréditaire en FVII. Le FVII est également préconisé dans le traitement d'accidents vasculaires cérébraux.

Certains patients hémophiles développent des anticorps inhibiteurs vis-à-vis du Facteur VIII administré, généralement sous forme concentrée, comme traitement de l'hémophilie. C'est aujourd'hui la complication la plus fréquente du traitement de l'hémophilie.

Des anticorps bispécifiques ciblant le FIX ou le FIXa et le FX ou le FXa, tels que l'Emicizumab, sont utilisés pour traiter des patients atteints d'hémophilie A, présentant des inhibiteurs anti-facteur VIII. Ces anticorps se substituent fonctionnellement au FVIII en favorisant l'activation du FX par le FIXa par rapprochement de ces deux molécules. Ces anticorps ont une action de longue durée.

La combinaison FVIIa recombinant issu de culture cellulaire (tel que Novoseven®, produit dans des cellules BHK) avec de l'Emicizumab (tel que ACE910 ou Hemlibra®) a été testée (*R. HARTMANN, et al. OR36 / Synergistic Effects of a Procoagulant Bispecific Antibody and FEIBA or Factor VIIA on Thrombin Generation (Haemophilia (2017), 23 (Suppl. 2), 11-27)*). Cette combinaison ne montre qu'un effet additif sur le traitement des troubles de la coagulation.

Il existe par conséquent le besoin d'une combinaison pharmaceutique permettant une meilleure prise en charge des patients hémophiles A, et plus particulièrement des patients présentant des anti-facteur VIII.

Résumé de l'invention

L'invention propose de combiner du facteur VII transgénique avec un anticorps multispecific dirigé contre les facteurs IX et X.

Selon l'invention, la combinaison de l'invention de facteur VII obtenu par transgénèse et d'anticorps dirigé contre le facteur IX et le facteur X induit un effet synergique dans le traitement des troubles de la coagulation, et particulièrement pour le traitement des patients atteints d'hémophilie A présentant des inhibiteurs anti-FVIII et de patients déficitaires en FVII.

Un aspect de l'invention est donc une composition pharmaceutique comprenant :

a. du facteur VII transgénique, et

b. un anticorps multispécifique, de préférence bispécifique, dirigé contre le facteur IX et le facteur X, tel que par exemple l'emicizumab.

De préférence, le facteur VII est sous la forme de facteur VII activé (FVIIa).

5

Dans un mode de réalisation particulier, le facteur IX est sous la forme de facteur IX activé (FIXa), et/ou le facteur X est sous la forme de facteur X activé (FXa).

De préférence, ledit facteur VII transgénique est un facteur VII humain issu d'une production
10 par les cellules épithéliales des glandes mammaires d'un mammifère non-humain transgénique, par exemple un lapin transgénique pour le facteur VII humain.

L'invention fournit également un produit de combinaison comprenant :

- a. du facteur VII transgénique, et
- 15 b. un anticorps multispécifique dirigé contre le facteur IX et le facteur X,
pour son utilisation dans la prévention ou le traitement d'un désordre de la coagulation, telle que l'hémophilie A, plus spécialement l'hémophilie A avec inhibiteurs de facteur VIII (FVIII).
De préférence, le produit de combinaison est sous la forme d'une composition pharmaceutique qui comprend à la fois le facteur VII transgénique et ledit anticorps.
- 20 De manière alternative, le facteur VII transgénique et l'anticorps sont sous la forme de compositions séparées, adaptées à une administration simultanée ou séparée (par exemple séquentielle) au patient.

Un autre objet de l'invention vise encore un kit comprenant

- 25 - Un récipient contenant un facteur FVII transgénique ; et
- Un autre récipient contenant un anticorps dirigé contre le facteur IX et le facteur X

Description détaillée de l'invention

30 *Définitions générales*

Le phénomène de coagulation comporte une cascade de réactions enzymatiques impliquant des facteurs de la coagulation présents sous forme de proenzymes qui, en présence de certains cofacteurs, sont convertis par clivage protéolytique en leur forme « **activée** ». La
35 forme activée de chaque facteur présent sous la forme de précurseur inactif est désignée par la lettre a. Ainsi le FVIIa résulte, in vivo, du clivage du zymogène par différentes protéases (FIXa, FXa, FVIIa) en deux chaînes réunies par un pont disulfure.

Le terme " **traitement** " ou " **traiter** " désigne généralement une amélioration, la prophylaxie, ou l'inversion d'une maladie ou d'un trouble, ou au moins d'un symptôme, par exemple le ralentissement de la progression d'une maladie, ou la stabilisation d'un symptôme. Est également inclus le retard de l'apparition d'une maladie ou trouble, ou d'au moins un symptôme.

Le terme "**prévention**" ou " **prévenir** " désigne une réduction du risque de développement ou d'acquisition d'une maladie ou d'un trouble spécifié.

Au sens de la présente invention, par « **patient** » ou « **sujet** », on entend tout mammifère, et plus particulièrement les êtres humains, hommes ou femmes, de tout âge, y compris les enfants.

Le terme « **composition pharmaceutique** » fait référence aux préparations permettant l'activité biologique des ingrédients actifs et ne contenant aucun composant additionnel toxique pour les sujets auxquels la composition est administrée.

15 *Facteur VII transgénique*

Le terme "**Facteur VII** " ou "**FVII**" inclut les polypeptides comprenant la séquence 1-406 du facteur VII humain de type sauvage (comme décrit dans le brevet U. S. 4,784, 950), ou du FVII dérivé d'une autre espèce (par exemple bovin, porcin, canin, murin). Il comprend en outre les variations alléliques naturelles du facteur VII qui peuvent exister, et toute forme ou degré de glycosylation ou autre modification post-traductionnelle. Le terme « Facteur VII » inclut aussi les variants du FVII qui présente la même ou une activité biologique supérieure par rapport à l'activité de la forme sauvage, ces variants incluant notamment les polypeptides différant du FVII sauvage par insertion, délétion, ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés.

Sauf indication contraire, dans la présente description, le terme « Facteur VII » se réfère indifféremment au FVII non clivé (zymogène) ou au Facteur VII activé (FVIIa).

Le FVIIa est donc composé d'une chaîne légère de 152 acides aminés de poids moléculaire d'environ 20 kDa et d'une chaîne lourde de 254 acides aminés de poids moléculaire d'environ 30 kDa liées entre elles par un seul pont disulfure (Cys135-Cys262).

Par « **facteur VII recombinant** », il est entendu tout facteur VII issu du génie génétique et résultant de l'expression du gène correspondant dans tout microorganisme, plante ou plante transgénique. Par microorganisme, il est entendu tout système bactérien, fongique, viral ou cellulaire. Le facteur VII recombinant peut également être produit à partir de cellules eucaryotes en culture telles que des cellules de plante ou de mammifère, par exemple des cellules animales ou humaines.

Par « **facteur VII transgénique** », il est entendu tout facteur VII recombinant obtenu à partir d'un animal transgénique pour le facteur VII.

5 Par « **animal transgénique** », on entend tout animal non-humain présentant une modification de son génome destinée à permettre l'expression d'une protéine d'intérêt (ici du facteur VII). La modification du génome peut résulter d'une altération, d'une modification ou de l'insertion d'un gène. Cette modification peut être due à l'action d'agents altérants ou mutagènes classiques ou bien effectuée par mutagenèse dirigée. La modification du génome peut
10 également résulter d'une insertion de gène(s) ou de remplacement de gène(s) dans sa (leur) forme sauvage ou mutée. L'animal transgénique peut être choisi de façon non limitative parmi le lapin, la chèvre, la vache, le chameau, le hamster, la souris, le rat, le cheval, la truie, le dromadaire, la brebis, le lama. Dans un mode de réalisation particulier, on peut choisir un animal n'exprimant pas l' α 1,3-galactosyltransférase.

15

Par l'expression « **activité biologique du facteur VIIa** », il est entendu la capacité du FVIIa à générer de la thrombine, par exemple à la surface des plaquettes activées. L'activité du facteur VII peut être évaluée de différentes manières. L'activité biologique du FVIIa peut par exemple être quantifiée en mesurant la capacité d'une composition de FVII à promouvoir la coagulation
20 du sang en utilisant un plasma déficient en FVII et en thromboplastine, comme décrit par exemple dans le brevet US No. 5,997,864. Dans cet essai, l'activité biologique est évaluée par rapport à un échantillon témoin et est converti en « unités de FVII » par comparaison avec un sérum humain standard poolé contenant 1 unité/ml d'activité de Facteur VII. Alternativement, l'activité biologique du facteur VII peut être quantifiée par (i) la mesure de la capacité du
25 Facteur VIIa à produire du facteur Xa dans un système comprenant du facteur tissulaire (FT) englobé dans une membrane lipidique et du Facteur X (Persson et al. J. Biol. Chem. 272 : 19919- 19924, 1997) ; (ii) en mesurant l'hydrolyse du facteur X dans un système aqueux ; (iii) en mesurant la liaison physique du FVIIa au FT par l'intermédiaire de la résonance plasmon de surface (Persson , FEBS letts, 413 :359-363, 1997), (iv) en mesurant l'hydrolyse d'un
30 substrat synthétique ou (v) en mesurant la génération de thrombine dans un système in vitro indépendant du FT.

Dans un mode de réalisation préféré, le FVII décrit ici est un polypeptide dont la séquence peptidique peut être celle du FVII humain naturel, c'est-à-dire la séquence présente chez les humains ne présentant pas de troubles liés au FVII. Une telle séquence est décrite dans le
35 document EP 0 200 421.

Avantageusement, la séquence du FVII utilisée dans l'invention est la séquence SEQ ID NO : 1.

Dans un mode de réalisation particulier, le facteur VII est obtenu à partir du lait d'un animal transgénique.

Une méthode de production d'une protéine recombinante dans le lait d'un animal transgénique
 5 peut comporter les étapes suivantes : une molécule d'ADN synthétique comprenant un gène codant pour une protéine d'intérêt (ici par exemple le FVII humain), ce gène étant sous le contrôle d'un promoteur d'une protéine sécrétée naturellement dans le lait, est intégrée dans un embryon d'un mammifère non humain. L'embryon est ensuite placé dans une femelle de mammifère de la même espèce. Une fois que le mammifère issu de l'embryon s'est
 10 suffisamment développé, la lactation du mammifère est induite, puis le lait recueilli. Le lait contient alors le FVII d'intérêt sécrété par l'animal transgénique.

Un exemple de préparation de protéine dans le lait d'une femelle de mammifère autre que l'être humain est donné dans la demande de brevet EP0527063, dont l'enseignement peut être repris pour la production du facteur VII de l'invention.

15 La sécrétion de facteur VII par les glandes mammaires, permettant sa sécrétion dans le lait du mammifère transgénique, implique le contrôle de l'expression du facteur VII de manière tissu-dépendante. De telles méthodes de contrôle sont bien connues de l'homme du métier. Le contrôle de l'expression est effectué grâce à des séquences permettant l'expression de la protéine vers un tissu particulier. Il s'agit notamment des séquences promotrices WAP, bêta-caséine, bêta-lactoglobuline et des séquences peptides signal, la liste n'étant pas limitative.
 20

Dans un mode de réalisation préféré, le facteur VII selon l'invention est produit dans le lait de lapines transgéniques.

De manière particulièrement avantageuse, l'expression dans les glandes mammaires de la
 25 lapine est effectuée sous le contrôle du promoteur de la bêta-caséine bien connu de l'homme du métier. En particulier, un plasmide contenant le promoteur bêta-caséine est fabriqué par introduction d'une séquence comportant le promoteur du gène bêta-caséine, ce plasmide étant réalisé de manière à pouvoir recevoir un gène étranger placé sous la dépendance de ce promoteur. Le gène codant pour le FVII humain est intégré, et placé sous la dépendance du
 30 promoteur bêta-caséine. Le plasmide contenant le promoteur et la séquence codant pour la protéine d'intérêt est digéré par des enzymes de restriction pour libérer le fragment d'ADN contenant le promoteur bêta-caséine et la séquence de FVII humain. Après purification, les fragments sont introduits, par microinjection dans le pronucléus mâle d'embryons de lapines Wild-type. Les embryons sont ensuite cultivés avant transfert dans l'oviducte de femelles Wild-
 35 type hormonalement préparées. A la mise bas de ces femelles, la descendance est évaluée par PCR pour déterminer les animaux transgéniques. Le nombre de copies du transgène et son intégrité est révélée par la technique de Southern à partir de l'ADN extrait des lapereaux

transgéniques obtenus. La concentration de FVII humain exprimé dans le lait des descendants femelles transgéniques est évaluée à l'aide de tests immuno-enzymatiques.

Dans un mode de réalisation particulier, le facteur VII utile dans l'invention est obtenu par un
5 procédé comprenant les étapes suivantes :

- (a) l'insertion d'une séquence d'ADN comprenant un gène codant pour le facteur VII dans un embryon de mammifère non-humain, ledit gène étant sous le contrôle transcriptionnel du promoteur bêta-caséine,
- 10 (b) le transfert d'embryons obtenus à l'étape a) dans l'oviducte de femelles de mammifère non humain de manière à ce qu'il se développe en un mammifère adulte non humain,
- (c) l'induction de la lactation chez le mammifère adulte non humain obtenu à l'étape b) de type femelle ou dans un descendant femelle de ce mammifère non humain dans lequel le gène et le promoteur sont présents dans son génome,
- 15 (d) la collecte du lait dudit mammifère non humain, et
- (e) la purification du FVII présent dans le lait collecté.

Le FVII transgénique utile ici présente un point isoélectrique substantiellement homogène.

- 20 Par « **point isoélectrique** » ou « **pl** », il est entendu le pH pour lequel la charge élémentaire nette de la molécule de facteur VII ou de facteur VIIa est nulle, c'est-à-dire le pH auquel la molécule est électriquement neutre (forme zwitterionique). Le point isoélectrique du facteur VII utile selon l'invention peut être mesuré en mettant en oeuvre une technique bien connue de l'homme du métier telle que la focalisation isoélectrique ou iso-electric focusing (« IEF »). Cette
- 25 technique électrophorétique permet la séparation des protéines sur la base de leur point isoélectrique. Elle consiste en une migration, induite par un courant électrique uniforme, des protéines dans un gradient de pH jusqu'à ce qu'elles atteignent un pH équivalent à leur point isoélectrique spécifique, moment auquel elles cessent de migrer puisque leur charge nette est nulle. Les gels IEF sont utilisés pour déterminer le point isoélectrique d'une protéine donnée.

30

- Par « **substantiellement homogène** », il est entendu qu'au moins 90%, de préférence au moins 95% des molécules de facteur VII de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH inférieure ou égale à 1,2. Dans un autre mode de réalisation de l'invention au moins 50%, de préférence au moins 55%, de préférence 60% des molécules de
- 35 facteur VII transgénique de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH inférieure à 1 ; de préférence inférieure à 0,5. Dans un autre mode de réalisation préféré, au moins 50%, de préférence au moins 55%, de préférence 60% des molécules de

facteur VII de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH de 0,4.

Par « **formes N-glycanniques** », il est entendu l'ensemble des formes N-glycanniques présentes sur les deux sites de N-glycosylation du facteur VII de l'invention. Les formes N-glycanniques sont dite monochargées, si leur charge totale est égale à 1. Au sens de la présente invention, par « charge », il est entendu un groupement phosphate, un groupement sulfate ou une molécule d'acide sialique. Ainsi les formes N-glycanniques sont dites monochargées, si elles contiennent uniquement un groupement phosphate ou un groupement sulfate ou une molécule d'acide sialique. Par opposition au terme « monochargée » le terme « bichargée » signifie que la charge totale portée par les formes N-glycanniques est égale à 2, c'est-à-dire qu'elles présentent deux charges choisies parmi un groupement phosphate, un groupement sulfate et/ou une molécule d'acide sialique. En d'autres termes, les formes N-glycanniques bichargées possèdent une molécule d'acide sialique et un groupement phosphate, ou une molécule d'acide sialique et un groupement sulfate, ou deux molécules d'acides sialiques, ou deux groupements phosphates, ou deux groupements sulfates, ou un groupement phosphate et un groupement sulfate. Le terme « trichargée » signifie que la charge totale portée par les formes N-glycanniques est égale à 3, c'est-à-dire qu'elles présentent trois charges choisies parmi un groupement phosphate, un groupement sulfate et/ou une molécule d'acide sialique. En d'autres termes, les formes N-glycanniques trichargées possèdent une molécule d'acide sialique et un groupement phosphate et un groupement sulfate, ou deux molécules d'acide sialique et un groupement phosphate, ou deux molécules d'acide sialique et un groupement sulfate, ou un groupement d'acide sialique et deux groupements phosphate, ou un groupement d'acide sialique et deux groupements sulfate, ou un groupement phosphate et deux groupements sulfate, ou un groupement sulfate et deux groupements phosphate ou trois molécules d'acide sialique, ou trois groupements phosphate, ou trois groupements sulfate. Le terme « neutre » quant à lui signifie que les formes N-glycanniques ne contiennent aucune charge.

La charge des formes N-glycanniques du facteur VII utile selon l'invention peut être mesurée en mettant en œuvre une technique bien connue de l'homme du métier, notamment par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance ayant une résine échangeuse d'anions couplée à une détection par fluorescence (AEX-UPLC/FD). Cette méthode permet de séparer les différentes formes N-glycanniques en fonction de leur charge apparente (voir en particulier, Hermentin et al, Glycobiology, vol.6, no. 2, 1996). Dans le cadre d'une chromatographie échangeuse d'anions, une résine chargée positivement est utilisée comme phase stationnaire. Ces résines chargées positivement sont généralement constituées d'un polymère réticulé ou gel, sur lequel des groupements chargés positivement sont greffés. Dans

un mode de réalisation avantageux de l'invention, une colonne échangeuse d'anions faible de type aminopropyl est utilisée.

Dans le cas de la composition de facteur VII utile selon l'invention, il apparaît que parmi toutes les formes N-glycanniques du facteur VII de la composition, au moins 50% des formes N-glycanniques, au moins 60% des formes N-glycanniques, de préférence au moins 65%, de préférence au moins 70%, de préférence au moins 75%, de préférence au moins 80%, de préférence au moins 85%, de préférence au moins 90%, de préférence au moins 95%, sont monochargées. Dans un mode de réalisation préféré, les molécules de facteur VII présentant des formes N-glycanniques monochargées représentent entre 50% et 95% des molécules de facteur VII de la composition, de préférence entre 50% et 90% des molécules de facteur VII de la composition, de préférence entre 50% et 80% des molécules de facteur VII de la composition, de préférence entre 50% et 75% des molécules de facteur VII de la composition, de préférence entre 50% et 70% des molécules de facteur VII de la composition, entre 50 et 65% des molécules de facteur VII de la composition, de préférence entre 50% et 60% des molécules de facteur VII de la composition.

Le point isoélectrique substantiellement homogène de la composition du facteur VII de la combinaison selon l'invention résulte de la combinaison des propriétés de glycosylation et de γ -carboxylation des molécules de FVII qui la composent.

Le facteur VII transgénique utile ici présente des caractéristiques de modifications post-traductionnelles. Il s'agit en particulier de modifications de la glycosylation, telles que deux sites de N-glycosylation avec un taux nul ou très faible de Gal α 1,3Gal dans la composition de FVII, ou encore assez faible pour ne pas être immunogène. Par opposition, le FVII décrit ici n'est pas un FVII plasmatique, c'est-à-dire qu'il n'est pas un produit purifié à partir de plasma humain ou animal. Plus particulièrement, le FVII transgénique utile ici présente des modifications post-traductionnelles, ainsi que deux sites de O-glycosylation à motifs glycanniques définis, une γ -carboxylation, et des ponts disulfures spécifiques.

Le FVIIa utile ici peut comporter plusieurs modifications post-traductionnelles : les neuf ou dix premiers acides glutamiques N-terminaux sont γ -carboxylés, l'Asp₆₃ est partiellement hydroxylé, la Ser₅₂ et la Ser₆₀ sont O-glycosylées et portent respectivement les motifs Glucose(Xylose)₀₋₂ et Fucose, l'Asn₁₄₅ et l'Asn₃₂₂ sont N-glycosylées majoritairement par des structures complexes biantennées monosialylées.

Avantageusement, les molécules de facteur VII transgénique utiles ici présentent, pour au moins 80% d'entre elles, une γ -carboxylation sur neuf résidus d'acide glutamique. Dans un autre mode de réalisation, au moins 85% desdites molécules présentent une γ -carboxylation

sur neuf résidus d'acide glutamique. Dans un autre mode de réalisation, entre 85% et 100%, de préférence entre 90% et 100%, de préférence entre 95% et 100% desdites molécules présentent une γ -carboxylation sur neuf résidus d'acide glutamique. Avantageusement, le taux de γ -carboxylation sur le résidu d'acide glutamique 35 (Glu 35) des molécules de facteur VII de la composition est inférieur à 20%. Dans un autre mode de réalisation, le taux de γ -carboxylation du résidu Glu35 est inférieur à 15%, de préférence inférieur à 10%, de préférence inférieur à 5%.

Le motif Gal α 1,3Gal est une structure composée de deux galactoses liés en α 1,3. Il est situé à l'extrémité des antennes oligosaccharidiques des structures N- liées. Ce motif est connu pour son immunogénicité. On préfère ainsi produire un FVII ou un FVIIa dont le taux de structures Gal α 1,3Gal est nul ou si faible qu'il ne peut être distingué du bruit de fond obtenu par les mesures mises en œuvre par les appareillages d'analyses actuellement disponibles. Cette expression désigne de manière équivalente tout FVII transgénique dont le taux de Gal α 1,3Gal est proche de celui du FVII plasmatique. Avantageusement, le taux de Gal α 1,3Gal de la composition de FVII décrite ici n'est pas immunogène pour l'homme. De plus, le FVII utile ici comporte de préférence, comme le FVII humain, deux sites de N-glycosylation, en position 145 et 322, et 2 sites de O-glycosylation, en position 52 et 60. Dans un site de N-glycosylation, les chaînes d'oligosaccharides sont liées à une asparagine (N- liées). Dans un site de O-glycosylation, les chaînes d'oligosaccharides sont liées à une serine. Les motifs liés sur ces acides aminés seront différents pour chaque protéine de la composition. Toutefois, on peut quantifier, pour la totalité de la composition, le taux de chaque motif glycanique, ou encore de chaque sucre.

Les pourcentages des différents glycannes donnés dans la présente demande ne tiennent pas compte de la O-glycosylation.

De préférence, la composition de FVII est caractérisée en ce que, parmi tous les motifs glycaniques du FVII de la composition, au moins 40% sont des formes glycaniques biantennées, monosialylées. Dans un autre mode de réalisation, les formes biantennées monosialylées sont présentes à au moins 50%. Dans un autre mode de réalisation, les formes biantennées monosialylées sont présentes à au moins 60%, de préférence au moins 65%, de préférence au moins 70%.

Avantageusement, les formes glycaniques biantennées, monosialylées du FVII sont majoritaires. La composition de FVII se caractérise en ce qu'au moins certains des acides sialiques du facteur VII impliquent des liaisons α 2-6.

Avantageusement, au moins 65% des acides sialiques du FVII impliquent des liaisons α 2,6. De façon très avantageuse, au moins 70%, voire 80% et, en particulier, au moins 90% des acides sialiques du FVII impliquent des liaisons α 2,6.

De façon particulièrement préférée, tous les acides sialiques impliquent des liaisons $\alpha 2,6$, c'est-à-dire que tous les acides sialiques sont liés au galactose par une liaison $\alpha 2,6$. La composition de FVII décrite ici peut en outre comprendre des acides sialiques de liaisons $\alpha 2-3$.

- 5 Selon des modes de réalisation de l'invention, de 65% à 100% des acides sialiques du FVII impliquent des liaisons $\alpha 2,6$. De façon plus préférée, de 70% ou 80% à 100% des acides sialiques du FVII impliquent des liaisons $\alpha 2,6$.

Avantageusement, parmi les formes glycaniques biantennées monosialylées du FVII, les formes glycaniques majoritaires sont non fucosylées.

10

De préférence, ces formes glycaniques biantennées monosialylées non fucosylées sont présentes dans le FVII de la composition à un taux supérieur à 20%. Avantageusement, ce taux est supérieur à 25%, ou encore supérieur à 40%. D'une manière particulièrement avantageuse, le taux de fucosylation de la composition de FVII est compris entre 20% et 50%.

- 15 Dans un mode de réalisation, ce taux peut être inférieur à 20%.

Dans un mode de réalisation particulier, au moins 10%, de préférence au moins 15%, de préférence au moins 20%, de préférence au moins 25% des formes N-glycaniques des facteurs VII de la composition sont high mannose/ hybride.

20

De façon préférée, le profil de glycosylation décrit ici procure au FVII une activité biologique et une stabilité améliorées. Les compositions de facteur VII présentant un point isoélectrique substantiellement homogène facilitent l'étape de formulation à un pH optimal, de préférence à un pH optimal de 6.0 ± 0.2 , des compositions pharmaceutiques en évitant la précipitation du FVII. En effet, il est connu qu'au point isoélectrique d'une molécule, celles-ci auront tendance à s'agréger et à précipiter. Les molécules de facteur VII utilisés dans la composition de l'invention ont un point isoélectrique compris entre 6.6 et 7.0. Il en résulte une meilleure stabilité de la composition de facteur VII, notamment lorsque celle-ci est formulée à un pH inférieur au point isoélectrique, et en particulier à pH 6.0. L'amélioration de la stabilité de la composition de facteur VII permet d'éviter les interactions électrostatiques responsables des phénomènes de précipitation et d'agréation de type soluble et insoluble, ainsi que d'éviter la perte de matières premières et donc une baisse de rendement aboutissant à une perte de quantité en principe actif et donc potentiellement à une perte d'activité.

35

Dans un mode de réalisation préféré, le FVII transgénique est produit par la lapine dans son lait permettant d'obtenir une composition où chaque molécule de facteur VII de la composition présente deux sites de N-glycosylation. De préférence toutes les molécules de FVII de la

composition ont un taux de motifs glycaniques Gal α 1,3Gal inférieur à 4%, voire nul. Ainsi, de manière avantageuse, le FVII transgénique produit par la lapine ne possède pas de motif glycanique Gal α 1,3Gal.

- 5 Le FVII peut être purifié à partir du lait par des techniques connues de l'homme du métier. Par exemple, une méthode de purification d'une protéine d'intérêt à partir de lait, telle que décrite dans le brevet US 6,268,487, peut comprendre les étapes suivantes consistant à : a) soumettre le lait à une filtration tangentielle sur une membrane de porosité suffisante pour former un retentat et un perméat, le perméat contenant la protéine exogène, b) soumettre le perméat à
- 10 un appareil de capture par chromatographie de manière à déplacer la protéine exogène et obtenir un effluent, c) combiner l'effluent et le retentat, d) répéter les étapes a) à c) jusqu'à ce que le FVII soit séparé des lipides, des micelles de caséines, et que le FVII soit récupéré à au moins 75%.
- 15 Avantageusement, le FVII de l'invention est sous forme activée. Dans un mode de réalisation, le FVII peut être activé in vitro par les facteurs Xa, VIIa, IIa, IXa ou XIIa. Le FVII peut également être typiquement activé au cours de son procédé de purification, en particulier par le passage sur des colonnes de chromatographie chargées positivement.

20 *Anticorps multispécifique*

Par « **anticorps multispécifique** », on entend tout anticorps possédant au moins deux sites de liaison spécifique à au moins deux antigènes différents, ou épitopes différents d'un même antigène. Le terme « spécifique » signifie que l'anticorps a la capacité de reconnaître et de lier

25 un antigène, substantiellement sans réaction croisée avec un autre antigène. De manière avantageuse, l'anticorps présente, vis-à-vis de chaque antigène, une constante d'affinité K_d d'au moins 10^{-6} M, de préférence au moins 10^{-7} M, de préférence encore au moins 10^{-8} M, 10^{-9} M, ou 10^{-10} M.

- 30 Ainsi, les anticorps utiles dans l'invention ont la capacité de se lier spécifiquement à la fois au facteur de coagulation IX et au facteur de coagulation X sous forme activée ou non.
- L'anticorps utilisé dans l'invention, qui possède la capacité de se lier spécifiquement à la fois au facteur de coagulation IX et au facteur de coagulation X possède préférentiellement la capacité d'agir comme substitut du facteur VIII (FVIII), ce qui signifie que l'anticorps favorise
- 35 l'activation du FX par le FIXa.

De tels anticorps multispécifiques, de préférence bispécifiques, peuvent être obtenus par diverses méthodes connues de l'homme du métier, par exemple par conjugaison chimique, ou en utilisant des quadromes, qui résultent de la fusion entre deux hybridomes produisant deux anticorps monoclonaux différents ; ou encore par recombinaison génétique.

- 5 Les polynucléotides codant pour de tels anticorps peuvent ainsi être insérés dans des vecteurs d'expression et exprimés dans des cellules ou organismes hôtes adaptés par des techniques bien connues de l'homme du métier.

Les anticorps utiles ici peuvent être de format très simple, construits à partir de fragments Fv à simple chaîne (scFv) de deux anticorps ou plus, associés par un linker peptidique adapté.

- 10 Par « Fv », il est entendu le plus petit fragment d'anticorps conservant les propriétés de reconnaissance et de liaison à l'antigène. Un fragment « Fv » est un dimère (dimère $V_H + V_L$) constitué d'une région variable (V_H) portée par une chaîne lourde (H) et d'une région variable (V_L) adjacente portée par une chaîne légère (L).

- Alternativement, il peut s'agir d'anticorps de pleine longueur, de préférence contenant une
 15 région Fc. Plusieurs formats sont possibles. Par exemple, dans un premier format, des fragments scFv d'un anticorps A sont fusionnés aux extrémités (en général N-terminales) des chaînes lourdes d'un anticorps B. L'anticorps résultant a un seul type de chaîne lourde, qui contient les domaines V_H , CH1, CH2 et CH3 de l'anticorps B et les domaines V_H et V_L de l'anticorps A, et un seul type de chaîne légère qui contient les domaines V_L et CL de l'anticorps
 20 B (Qu et al. Blood, 111, 2211-2219, 2008). Dans un deuxième format, la chaîne lourde et la chaîne légère d'un anticorps A sont associées à la chaîne lourde et la chaîne légère d'un anticorps B. Le cas échéant, des mutations, par exemple de type "knob into holes" (Ridgway et al, Protein Eng, 9, 617-21, 1996; brevet US 7,695,936) peuvent être introduites pour éviter les mésappariements.

25

Sauf indication contraire, dans la présente description, le terme « Facteur IX » se réfère indifféremment au Facteur IX non activé ou au Facteur IX activé (FIXa).

- Sauf indication contraire, dans la présente description, le terme « Facteur X » se réfère
 30 indifféremment au Facteur X non activé ou au Facteur X activé (FXa).

- Un anticorps reconnaissant (i) le FIX et/ou le FIXa, et (ii) le FX et/ou le FXa peut être obtenu notamment selon les méthodes décrites dans les demandes de brevets WO2005/035756,
 35 WO2006/109592 ou WO2012/067176.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit anticorps est l'emicizumab. La production de cet anticorps est décrite par exemple dans la demande de brevet WO2018047813 ou la demande de brevet EP1688488.

5 *Compositions pharmaceutiques et posologies*

Facteur VII et anticorps peuvent être formulés sous la forme de compositions pharmaceutiques séparées, ou combinés au sein d'une même composition pharmaceutique.

Dans le cas d'administration séparée, FVII et anticorps peuvent être formulés de manière adaptée à une administration selon des voies différentes ou identiques.

Ainsi le FVII peut être administré par exemple par voie intraveineuse, sous-cutanée, ou intramusculaire.

L'anticorps peut être administré également par exemple par voie intraveineuse, sous-cutanée, ou intramusculaire.

15

Une composition de Facteur VII peut par exemple être telle que celle décrite dans la demande de brevet WO2010/149907.

Ainsi, dans un exemple de réalisation, la composition comprend :

- facteur VII, de préférence sous forme de facteur VIIa ;
- 20 - arginine, éventuellement sous forme de chlorhydrate ;
- isoleucine ;
- lysine ;
- glycine ;
- citrate trisodique ou chlorure de calcium ;
- 25 - et le cas échéant du polysorbate 80 ou polysorbate 20.

Plus particulièrement, la composition peut comprendre :

- facteur VII, de préférence sous forme de facteur VIIa ;
- de 10 à 40 g/l d'arginine, éventuellement sous forme de chlorhydrate ;
- de 4,2 à 6,6 g/l d'isoleucine ;
- 30 - de 0,6 à 1,8 g/l de lysine ;
- de 0,6 à 1,8 g/l de glycine ;
- de 0 à 0,2 g/l de citrate trisodique ou de 1 à 2 g/L de chlorure de calcium ;
- et le cas échéant de 0 à 0,5 g/l de polysorbate 80.

35 La composition de FVII, qui comprend éventuellement également au moins un anticorps multispécifique tel que décrit ici, peut être stockée sous forme liquide ou sous forme solide, obtenue typiquement par dessiccation. Les concentrations divulguées ci-dessus sont

déterminées vis-à-vis des compositions sous forme liquide, avant dessiccation, ou après reconstitution sous forme de préparation injectable.

La dessiccation est un procédé d'élimination de l'eau à un stade poussé. Il s'agit d'une déshydratation visant à éliminer autant d'eau que possible. Ce phénomène peut être naturel ou forcé. Cette dessiccation peut être réalisée à l'aide des techniques de lyophilisation, d'atomisation et de cryoatomisation.

Le mode préféré d'obtention de la forme solide de la composition à usage pharmaceutique décrite ici est la lyophilisation.

Les méthodes de lyophilisation sont bien connues de l'homme du métier, voir par exemple [Wang et al, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, Vol 203, p 1-60, 2000].

D'autres procédés appropriés pour réduire le degré d'humidité ou la teneur en eau de la composition sont envisageables. De préférence le degré d'humidité est inférieur ou égal à 3% en poids, de préférence inférieur ou égal à 2,5%, de préférence inférieur ou égal à 2%, de préférence inférieur ou égal à 1,5%.

La composition solide, de préférence sous forme lyophilisée, peut être dissoute dans de l'eau pour préparations injectables (ou « water for injection ou WFI »), pour obtenir une formulation à usage thérapeutique.

La formulation injectable peut être administrée par voie parentérale (intraveineuse, souscutanée, intramusculaire), en une quantité appréciée par le praticien. L'administration de la forme liquide (avant dessiccation) ou de la forme solide, par toute voie et tout moyen appropriés, n'est pas exclue.

Le dosage de FVII utile dans l'invention, peut être déterminé de façon appropriée selon le type de formulation, la méthode d'administration, l'âge et le poids du patient, les symptômes du patient, la gravité de la maladie, etc.

La dose de FVII à administrer selon l'invention peut avantageusement être choisie entre 270 µg/kg et 2.70 µg/kg. De façon préférée la dose de FVII à administrer est inférieure à 270 µg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 225 µg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 180µg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 135 µg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 90 µg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 45 µg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 9 µg/kg, de manière préférée elle est inférieure à 5.4 µg/kg, de manière préférée elle est inférieure à 2.7µg/kg.

Une composition d'anticorps multispécifique, comme l'anticorps emicizumab, est par exemple telle que celles décrites dans les demandes de brevet WO2017/188356 et WO2018/047813.

Ainsi, dans un exemple de réalisation, la composition est une composition liquide.

5

Dans un exemple de réalisation la composition comprend :

- anticorps bispécifique du facteur IX et du facteur X,
- un surfactant tel que le poloxamer 188 ou de polysorbate 20
- tampon histidine - acide aspartique
- 10 - arginine

Plus particulièrement, la composition peut comprendre :

- de 20mg/mL à 180mg/mL d'anticorps bispécifique du facteur IX et du facteur X,
- de 0.2 mg/mL à 1mg/mL de poloxamer 188,
- 15 - de 10mM à 40mM de tampon histidine-acide aspartique
- de 100mM à 300mM d'arginine,

à un pH compris entre 4.5 et 6.5

Le dosage de la composition d'anticorps multispécifique, tel que l'anticorps emicizumab, utile
 20 dans l'invention, peut être déterminée de façon appropriée selon le type de formulation, la méthode d'administration, l'âge et le poids du patient, les symptômes du patient, la gravité de la maladie, etc. La dose d'anticorps peut être par exemple de 0.3 à 5 mg/kg, de préférence d'au maximum 3 mg/kg une fois par semaine pendant une période d'initiation, qui peut durer par exemple 4 semaines, suivie d'une dose de maintenance, qui est de préférence plus
 25 réduite, par exemple de 1.5 mg/kg une fois par semaine. De façon préférée la dose d'anticorps administrée est inférieure à 5 mg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 3 mg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 1.5 mg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 1 mg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 0.5 mg/kg de poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 0.1 mg/kg de
 30 poids corporel, de façon préférée elle est inférieure à 0.05 mg/kg de poids corporel.

La composition d'anticorps utile dans l'invention peut être administrée à un patient selon n'importe quelle voie appropriée, par exemple, par voie intraveineuse, intramusculaire, intrapéritonéale, intracérébrospinale, transdermale, sous-cutanée, intra-articulaire, sublinguale, intra-synoviale, orale ou par inhalation. De façon préférée, la voie intraveineuse
 35 ou la voie sous-cutanée est privilégiée.

Selon un mode de réalisation particulier, le facteur VII et l'anticorps sont administrés simultanément au patient.

Selon un autre mode de réalisation particulier, le facteur VII et l'anticorps sont administrés séparément chez un patient, de préférence de manière séquentielle.

5

Indications thérapeutiques

La combinaison décrite ici permet de prévenir ou traiter des désordres de la coagulation, notamment des hémophilies présentant un déficit en facteur VIII (hémophilie de type A, de
10 préférence hémophilie A acquise).

De préférence les patients sont des patients qui présentent une hémophilie de type A, avec anti-Facteur VIII.

La combinaison décrite ici permet de prévenir ou traiter des désordres de la coagulation, notamment des déficiences en facteurs VII.

15

La combinaison décrite ici permet d'associer l'effet rapide du FVII activant la voie extrinsèque de la cascade de la coagulation et l'effet prolongé des anticorps multispécifiques décrits ici qui activent la voie intrinsèque de la cascade de la coagulation. La combinaison permet d'offrir une meilleure prise en charge des patients.

20

Exemples :

Exemple 1 : Purification et extraction du FVII transgénique

Le procédé de purification et d'extraction du facteur VII mis en oeuvre dans cet exemple est celui décrit dans la demande EP12305882. Les étapes de ce procédé sont décrites ci-après.

25 Le lait de lapines transgéniques est obtenu à partir de la lignée de lapines transgéniques. Le lait de lapines transgéniques congelé est décongelé et concentré sous forme de pool de lait de lapines transgéniques.

30 Le pool de lait de lapines transgéniques ainsi obtenu est ensuite soumis à une étape de clarification utilisant un filtre en profondeur ayant une porosité de 0,2µm, afin d'éliminer les lipides et les composés insolubles. Le lait ainsi clarifié est ensuite soumis à une étape d'inactivation virale par traitement par un solvant de type détergent, par exemple Polysorbate 80 ou Tri-n-Butyl Phosphate à 25°C ± 2°C pendant au moins deux heures. Un tel traitement permet notamment d'inactiver efficacement les virus et en particulier, les virus de type virus
35 non-enveloppés. Le lait clarifié et viralement inactivé est ensuite soumis à une étape de chromatographie d'affinité utilisant un ligand d'affinité spécifique du facteur VII/facteur VIIa. L'éluat de facteur VII obtenu à l'issue de cette étape de chromatographie est ensuite soumis

à une étape d'ultrafiltration et de formulation, permettant ainsi d'obtenir un concentré de facteur VII intermédiaire ayant une pureté de 95%.

Le concentré de facteur VII intermédiaire est ensuite soumis à une étape de filtration utilisant un filtre ayant une porosité de 0,2µm à 0,2µm suivi d'une étape de nanofiltration sur des filtres ayant une porosité de 20nm puis 15nm. Le produit ainsi obtenu et contenant le facteur VII est ensuite soumis à une étape de chromatographie de type gel Q Sepharose XL puis à une étape de chromatographie de type CHT-I suivie d'une chromatographie de type SEC Superdex 200. Le concentré de facteur VII ainsi obtenu est ensuite soumis à une étape de stabilisation puis de filtration sur filtre ayant une porosité de 0,2µm.

Le procédé ainsi décrit permet d'obtenir un concentré de facteur VII ayant une pureté d'environ 99,9995%.

Exemple 2 : Comparaison du potentiel thrombogène de Novoseven®, Sevenfact® et Hemlibra®

L'Homme du Métier peut mesurer le potentiel thrombogène de Novoseven®, Sevenfact® et Hemlibra® (appelé aussi Emicizumab) en réalisant le protocole suivant.

Réactifs :

- calibrateur thrombine (Stago)
- réactif PPP 5 pM (Stago)
- réactif PPP low (Stago)
- CK-Prest (Stago)
- Fluo-buffer (Stago)
- Fluo-substrat (Stago)
- Plasma déficient en FVIII (Siemens)
- Sevenfact®/Facteur VII transgénique produit chez le lapin 1 mg/ml (LFB)
- PNP (Cryo pep)
- Novoseven® (NovoNordisk)
- Hemlibra®/Emicizumab (Roche / Genentech / Chugai)

Méthode :

Le test de génération de thrombine consiste à activer la coagulation ex vivo soit avec un mélange de facteur tissulaire et de phospholipides (TF / PL), soit en utilisant de la céphaline puis en mesurant la concentration de thrombine générée au cours du temps.

- 5 • Mesure du potentiel thrombogène de Novoseven® après induction de la coagulation avec TF / PL :

Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µl de réactif PPP (Stago) contenant 0,5 µM de Facteur Tissulaire (TF) et 4 µM de phospholipides (PL).

- 10 La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

La dose thérapeutique de FVIIa est de 270 µg / kg, ce qui correspond à 6 µg / ml de FVIIa dans le plasma, en considérant une récupération de 100%. Le test de génération de thrombine est réalisé aux doses de Novoseven® de 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5
15 µg/mL, et 6 µg/mL, en présence de 0,5 µM TF / 2 µM PL (inducteur de la coagulation).

- Mesure du potentiel thrombogène de Novoseven® après induction de la coagulation avec la céphaline :

- 20 Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µL de céphaline (CK-Prest reconstituée avec 5 mL de H₂O distillée).

La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

- 25 Le test de génération de thrombine est réalisé aux doses de Novoseven® de 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, et 6 µg/mL, en présence de 20 µL de céphaline (inducteur de la coagulation).

- Mesure du potentiel thrombogène de Sevenfact® après induction de la coagulation avec TF / PL :

- 30 Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µl de réactif PPP (Stago) contenant 0,5 µM de Facteur Tissulaire (TF) et 4 µM de phospholipides (PL).

La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

Le test de génération de thrombine est réalisé aux doses de Sevenfact® de 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, et 6 µg/mL, en présence de 0,5 µM TF / 2 µM PL (inducteur de la coagulation).

- Mesure du potentiel thrombogène de Sevenfact® après induction de la coagulation avec la céphaline :

Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µL de céphaline (CK-Prest reconstituée avec 5 mL de H₂O distillée).

La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

Le test de génération de thrombine est réalisé aux doses de Sevenfact® de 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, et 6 µg/mL, en présence de 20 µL de céphaline.

- Mesure du potentiel thrombogène d'Hemlibra® après induction de la coagulation avec TF / PL :

Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µl de réactif PPP (Stago) contenant 0,5 µM de Facteur Tissulaire (TF) et 4 µM de phospholipides (PL).

La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

Hemlibra® (Roche / Genentech / Chugai, USA), un anticorps bispécifique mimant la fonction du FVIII, est utilisé à la concentration maximale de 50 µg/ml qui est la concentration détectée chez le patient sous traitement (Oldenburg et al. NEJM, 2017). Le test de génération de thrombine est réalisé aux doses de Hemlibra® de 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml et 50 µg/ml, en présence de 0,5 µM TF / 2 µM PL (inducteur de la coagulation).

- Mesure du potentiel thrombogène d'Hemlibra® après induction de la coagulation avec la céphaline

Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µL de céphaline (CK-Prest reconstituée avec 5 mL de H₂O distillée).

5 La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

Le test de génération de thrombine est réalisé aux doses de Hemlibra® de 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml et 50 µg/ml, en présence de 20 µL de céphaline.

10 Pour l'ensemble de ces tests, l'apparition de la fluorescence est mesurée sur un fluorimètre Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et à une longueur d'émission de 460 nm. Les thrombinogrammes (courbes représentant l'intensité de la fluorescence dans le temps) sont ensuite analysés en utilisant le logiciel Thrombinoscope™, qui convertit la valeur de fluorescence en nM de thrombine par un calcul comparatif.

15 La génération de thrombine est effectuée et les variables clés pour évaluer la puissance des différents médicaments sont enregistrées et comparées: potentiel de thrombine endogène (ETP), hauteur de pic, temps de latence et vitesse.

20 **Exemple 3: Evaluation des potentiels thrombogènes synergiques de Novoseven® et Hemlibra® ou SevenFact® et Hemlibra®**

L'Homme du Métier peut mesurer le potentiel thrombogène des combinaisons Novoseven®/Hemlibra® et Sevenfact®/Hemlibra® en réalisant le protocole suivant.

Réactifs :

25 Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental dans le plasma déficient en FVIII sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 2.

Méthode :

- Mesure du potentiel thrombogène de la combinaison Novoseven® + Hemlibra® après
30 induction de la coagulation avec TF / PL :

Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µl de réactif PPP (Stago) contenant 0,5 µM de Facteur Tissulaire (TF) et 4 µM de phospholipides (PL).

5 La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

Le test de génération de thrombine est réalisé en présence de 0,5 µM TF / 2 µM PL (inducteur de la coagulation) sur plusieurs combinaisons Novoseven®/Hemlibra®. La composition contenant la plus grande quantité de produit est constituée de 6 µg/ml de Novoseven® et de 50 µg/ml d'Hemlibra®, à leur maximum.

10 Le potentiel thrombogène obtenu en présence de la combinaison de produits est comparé au potentiel des produits uniques. Pour envisager un effet synergique de la combinaison de produit, des doses plus faibles sont évaluées pour être sûr de ne pas saturer la détection de la thrombine.

Les compositions testées contiennent :

Combinaison	Hemlibra® (µg/mL)	NovoSeven® (µg/mL)
Combinaison 1	50	6
Combinaison 2	50	5
Combinaison 3	40	4
Combinaison 4	30	3
Combinaison 5	20	2
Combinaison 6	10	1

15

- Mesure du potentiel thrombogène de la combinaison Novoseven® + Hemlibra® après induction de la coagulation avec la céphaline

20 Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µL de céphaline (CK-Prest reconstituée avec 5 mL de H₂O distillée).

La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

25 Le test de génération de thrombine est réalisé en présence de 20 µL de céphaline sur plusieurs combinaisons Novoseven®/Hemlibra®. La composition contenant la plus grande quantité de produit est constituée de 6 µg/ml de Novoseven® et de 50 µg/ml d'Hemlibra®, à leur maximum.

Le potentiel thrombogène obtenu en présence de la combinaison de produits est comparé au potentiel des produits uniques. Pour envisager un effet synergique de la combinaison de produit, des doses plus faibles sont évaluées pour être sûr de ne pas saturer la détection de la thrombine.

5 Les compositions testées contiennent :

Combinaison	Hemlibra® (µg/mL)	NovoSeven® (µg/mL)
Combinaison 1	50	6
Combinaison 2	50	5
Combinaison 3	40	4
Combinaison 4	30	3
Combinaison 5	20	2
Combinaison 6	10	1

- Mesure du potentiel thrombogène de la combinaison de Sevenfact® + Hemlibra® après induction de la coagulation avec TF / PL

10 Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µl de réactif PPP (Stago) contenant 0,5 µM de Facteur Tissulaire (TF) et 4 µM de phospholipides (PL).

La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

15 Le test de génération de thrombine est réalisé en présence de 0,5 µM TF / 2 µM PL (inducteur de la coagulation) sur plusieurs combinaisons Sevenfact®/Hemlibra®. La composition contenant la plus grande quantité de produit est constituée de 6 µg/ml de Sevenfact® et de 50 µg/ml d'Hemlibra®, à leur maximum.

20 Le potentiel thrombogène obtenu en présence de la combinaison de produits est comparé au potentiel des produits uniques. Pour envisager un effet synergique de la combinaison de produit, des doses plus faibles sont évaluées pour être sûr de ne pas saturer la détection de la thrombine.

Les compositions testées contiennent :

Combinaison	Hemlibra® (µg/mL)	Sevenfact® (µg/mL)
Combinaison 1	50	6
Combinaison 2	50	5

Combinaison 3	40	4
Combinaison 4	30	3
Combinaison 4	20	2
Combinaison 6	10	1

- Mesure du potentiel thrombogène de la combinaison Sevenfact® + Hemlibra® après induction de la coagulation avec la céphaline

- 5 Le test de génération de thrombine est réalisé sur 80 µl d'un pool de plasma déficient en FVIII qui mime un plasma d'hémophilie A en présence de 20 µL de céphaline (CK-Prest reconstituée avec 5 mL de H₂O distillée).

La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui est le début de la mesure de la génération de thrombine.

- 10 Le test de génération de thrombine est réalisé en présence de 20 µL de céphaline sur plusieurs combinaisons Sevenfact®/Hemlibra®. La composition contenant la plus grande quantité de produit est constituée de 6 µg/ml de Sevenfact® et de 50 µg/ml d'Hemlibra® à leur maximum.

- 15 Le potentiel thrombogène obtenu en présence de la combinaison de produits est comparé au potentiel des produits uniques. Pour envisager un effet synergique de la combinaison de produit, des doses plus faibles sont évaluées pour être sûr de ne pas saturer la détection de la thrombine.

Les compositions testées contiennent :

Combinaison	Hemlibra® (µg/mL)	Sevenfact® (µg/mL)
Combinaison 1	50	6
Combinaison 2	50	5
Combinaison 3	40	4
Combinaison 4	30	3
Combinaison 5	20	2
Combinaison 6	10	1

Pour l'ensemble de ces tests, l'apparition de la fluorescence est mesurée sur un fluorimètre Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et à une longueur d'émission de 460 nm. Les thrombinogrammes (courbes représentant l'intensité de la fluorescence dans le temps) sont ensuite analysés en utilisant le logiciel ThrombinoscopeTM, qui convertit la valeur de fluorescence en nM de thrombine par un calcul comparatif.

Un effet synergique est par exemple considéré lorsqu'au moins l'un des paramètres calculés à partir du test de génération de thrombine pour une combinaison donnée est supérieur à la somme de chacun de ces paramètres obtenus avec les composants seuls, déduits du bruit de fond de l'expérience.

Revendications

1. Composition pharmaceutique comprenant :
 - a. du Facteur VII transgénique, et
 - b. un anticorps multispécifique dirigé contre le facteur IX et le facteur X.
2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, dans laquelle ledit facteur VII transgénique est un facteur VII humain issu d'une production par les cellules épithéliales des glandes mammaires d'un mammifère non-humain transgénique.
3. Composition pharmaceutique selon la revendication 2, dans laquelle ledit mammifère transgénique est le lapin.
4. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle l'anticorps est l'emicizumab.
5. Produit de combinaison comprenant :
 - a. du Facteur VII transgénique, et
 - b. un anticorps multispécifique dirigé contre le facteur IX et le facteur X, pour son utilisation dans la prévention ou le traitement d'un désordre de la coagulation chez un patient.
6. Produit de combinaison pour son utilisation selon la revendication 5, dans le traitement de l'hémophilie A.
7. Produit de combinaison pour son utilisation selon l'une des revendications 5 ou 6, dans le traitement de l'hémophilie A avec inhibiteurs de facteur VIII
8. Produit de combinaison pour son utilisation selon les revendications 5 à 7, ledit produit de combinaison étant sous la forme d'une composition pharmaceutique telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 4.
9. Produit de combinaison pour son utilisation selon les revendications 5 à 8, ledit facteur VIIa et ledit anticorps étant sous une forme adaptée à une administration simultanée au patient.

10. Produit de combinaison pour son utilisation selon les revendications 5 à 8, ledit facteur VIIa et ledit anticorps étant sous des formes adaptées à une administration de façon séparée audit patient.

5

11. Kit comprenant

- Un récipient contenant un facteur FVII transgénique ; et
- Un autre récipient contenant un anticorps dirigé contre le facteur IX et le facteur X.

10