

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



PCT

(43) Date de la publication internationale  
28 juin 2007 (28.06.2007)

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2007/071845 A2**

(51) Classification internationale des brevets : Non classée

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2006/002817

(22) Date de dépôt international :  
19 décembre 2006 (19.12.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0512875 19 décembre 2005 (19.12.2005) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT  
ET DES BIOTECHNOLOGIES GROUPEMENT  
D'INTERÊT PUBLIC [FR/FR]; 3, Avenue des Tropiques,  
ZA de Courtabœuf, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : BARDAT,  
Annie [FR/FR]; 3 allée des Diziaux, F-91470 Limours  
(FR).

(74) Mandataire : CABINET LEPEUDRY; 43, rue de la  
Brèche aux Loups, F-75012 PARIS (FR).

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 2007/071845 A2

(54) Title: THE INVENTION RELATES TO A METHOD OF VIRAL INACTIVATION BY DRY HEATING

(54) Titre : L'INVENTION CONCERNE UN PROCEDE D'INACTIVATION VIRALE PAR CHAUFFAGE A SEC

(57) Abstract: The invention relates to a method of viral inactivation by dry heating of a virus present or potentially present in a biological product that has been dried according to the glass transition temperature.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé d'inactivation virale par chauffage à sec d'un virus présent ou potentiellement présent dans un produit biologique séché selon la température de transition vitreuse.

L'invention concerne un procédé d'inactivation virale par chauffage à sec.

DOMAINE DE L'INVENTION

5

Toute matière biologique solide présente un risque de contamination virale et celle-ci, ou ses produits dérivés, ou des produits issus de procédés dans lesquels elle interviendrait, doivent être soumis à 10 des procédés d'inactivation virale en vue d'être utilisés en thérapie ou en prophylaxie.

On utilise dans le domaine thérapeutique ou prophylactique des principes actifs issus de sources biologiques ou des principes actifs susceptibles 15 d'être contaminés par une source biologique au cours de leur procédé de fabrication.

Ces principes actifs peuvent être des protéines, peptides, polypeptides, anticorps, éventuellement substitués par des groupes lipidiques ou glucidiques, 20 des acides nucléiques, ADN, ARN, des polysaccharides, des bactéries, des particules virales et autres.

La source biologique dont ils sont issus ou susceptible de contaminer leur procédé d'obtention peut être n'importe quel tissu humain ou animal, le 25 sang, le plasma, les os, n'importe quel tissu végétal, n'importe quel micro-organisme, un milieu de culture cellulaire, de culture de virus, de bactéries, de levures, de moisissures, de champignons.

Par conséquent, il est courant d'inclure dans les 30 étapes d'extraction des principes actifs produits à partir de telles sources biologiques, des étapes de réduction ou inactivation virale.

On entend par produit biologique au sens de la présente invention un produit comprenant un principe 35 actif produit à partir d'une source biologique et d'autres composés ou excipients provenant du procédé d'obtention dudit principe actif.

Des méthodes d'inactivation virale par traitement avec

des produits chimiques et/ou la chaleur sont connues de l'art antérieur. La grande majorité de celles-ci provient du domaine de la transfusion sanguine dans lequel l'efficacité d'une inactivation virale est cruciale puisqu'il faut tenter de s'affranchir de la contamination éventuelle résultant de produits issus d'un donneur.

Le chauffage a été préconisé dès le début de la reconnaissance de l'origine virale du VIH pour inactiver celui-ci, en particulier dans le sang, le plasma, les produits biologiques issus du sang ou du plasma. Le chauffage à sec c'est-à-dire le chauffage à une température  $T$  pendant un temps  $t$  d'un produit sec a été préconisé, par exemple pour les concentrés de facteur de la coagulation lyophilisés ou cryodesséchés qui n'ont pas été chauffés sous forme liquide. Par exemple, le facteur VIII de la coagulation sanguine, extrait du plasma humain, a été chauffé à 60°C pendant 72 à 96 h à l'état lyophilisé pour sécuriser ce principe actif biologique destiné à traiter les hémophiles. Cependant, l'inconstance des réductions de titre viral a fait abandonner ce procédé car plusieurs cas de contamination par le VIH chez les hémophiles ont été recensés malgré ce chauffage.

Il a donc été proposé de soumettre ces produits à des conditions de chauffage dites « sévères », c'est-à-dire une température de 80°C pendant 72h à l'état sec. Ce procédé d'inactivation virale a alors été validé pour le VIH (virus enveloppé) suite aux résultats cliniques obtenus pour un facteur VIII traité dans ces conditions (L. Winkelmann et al., « Severe Heat Treatment of Lyophilised Coagulation Factors », Curr Stud Hematol Blood Transfus, 1989, n°56, p55-69).

Le traitement des protéines purifiées avec un mélange de solvant et de détergent est également largement utilisé pour prévenir la transmission des virus enveloppés par des protéines dérivées de sources biologiques (Piet et al., Transfusion, 30 :592-98,

1990). Ce traitement est efficace contre les virus présentant une enveloppe lipidique, beaucoup moins contre ceux qui ne présentent pas une telle structure. Récemment, la transmission d'au moins deux virus non-enveloppés par l'utilisation d'un produit biologique traité par solvant/détergent a été décrite. Le virus de l'hépatite A, virus à ARN non-enveloppé, a été transmis à des patients utilisant un Facteur VIII qui avait été traité par solvant/détergent (Purcell et al., Vox Sang, 67 :2-7, 1994). Le Facteur VIII a également été impliqué dans la transmission d'un parvovirus non-enveloppé, B19 (Lefrere et al., Lancet, 343 :211-12, 1994).

Le traitement des protéines purifiées par chauffage a été préconisé pour étendre le spectre d'inactivation virale aux virus non-enveloppés. Cependant, l'inactivation par chauffage de virus non-enveloppés est généralement plus difficile que celle des virus enveloppés et requiert souvent un traitement plus long et/ou des températures plus élevées pour assurer une inactivation satisfaisante. B19 a été transmis à des patients par un Facteur VIII qui avait été chauffé à sec à 100°C pendant 30 min (Santagostino et al., Lancet 343 :798, 1994).

Il est donc clairement important de déterminer comment améliorer les méthodes d'inactivation virale pour maintenir ou améliorer la sécurité des produits biologiques.

30 ART ANTERIEUR

De nombreux auteurs ont cherché à observer les paramètres majeurs qui influent sur l'inactivation virale par chauffage à sec. Leur but est de déterminer un paramètre physico-chimique qui permettrait de prédire si un traitement donné est adapté à la matière solide à traiter ou non c'est-à-dire s'il permet une inactivation virale satisfaisante tout en conservant une stabilité satisfaisante du produit. De plus, il

serait extrêmement intéressant que ce paramètre soit modulable et qu'en fonction de cette modulation on puisse favoriser l'inactivation virale ou la stabilité du produit.

- 5 On définit le facteur de réduction virale d'un procédé d'inactivation virale comme le facteur de réduction du titre viral c'est-à-dire le  $\log_{10}$  du rapport du titre viral avant l'étape d'inactivation au titre viral après l'étape d'inactivation.
- 10 On définit le taux d'humidité comme la quantité d'eau en poids pour 100g de produit. C'est pourquoi il est exprimé en pourcentage en poids. La méthode classique de mesure consiste à déterminer la perte en poids du produit après chauffage à une température supérieure à
- 15 100°C jusqu'à ce que le poids du produit soit constant.

Willkommen et al. (Paul Ehrlich Institute) ont montré que pour les lyophilisats à faible taux d'humidité (< 0,8%), les facteurs de réduction du virus de l'hépatite A (VHA) obtenus par chauffage à 80°C pendant 72 h vont de 0 à 0,4  $\log_{10}$  alors que pour les lyophilisats à fort taux d'humidité (> 0,8%), les facteurs de réduction du virus de l'hépatite A obtenus dans les mêmes conditions sont supérieurs ou égaux à

25 4,3  $\log_{10}$ .

Bunch et al. (Alpha Therapeutic Corporation) ont montré que deux taux d'humidité différents (0,4 et 1,4%) d'un facteur VIII recombinant n'avaient aucune influence sur le facteur de réduction du virus de l'hépatite A ( $\geq 6,9 \log_{10}$ ) par chauffage à 80°C pendant 72h.

Roberts PL et al. (Biologicals. 2000 Sep; 28(3):185-8., "Comparison of the inactivation of canine and bovine parvovirus by freeze-drying and dry-heat treatment in two high purity factor VIII concentrates") ont montré l'influence de la formulation du produit biologique et de la résistance du virus par inactivation virale de 2 parvovirus bovin

- 5 -

et canin par chauffage à 80°C pendant 72h d'un concentré de Facteur VIII dans 2 formulations lyophilisées.

Hart HF et al. (Vox Sang. 1994;67(4):345-50 "Effect of terminal (dry) heat treatment on non-enveloped viruses in coagulation factor concentrates") ont obtenu le même facteur de réduction du virus de l'hépatite A dans des lyophilisats de Facteur VIII par chauffage à 80°C pendant 24h ou 90°C pendant 2h.

10 Tomokiyo et al. (Vox Sang. 2003 Jan ; 84(1):54-64. "Large-scale production and properties of human plasma-derived activated Factor VII concentrate") ont montré, par inactivation de différents virus : CMV (Cytomégavirus), VIH (Virus de l'Immunodéficience 15 acquise Humaine), BVDV (Virus de la Diarrhée Virale Bovin), Poliovirus, PPV (Parvovirus Porcin) dans des lyophilisats de Facteur VIIa, que l'inactivation virale dans des lyophilisats est possible à 65°C. Un chauffage à 65°C pendant 96h sur des produits dont le 20 taux d'humidité est < 1,7% montre des facteurs de réduction virale > 4 log<sub>10</sub> sur l'ensemble des virus sauf le PPV.

La demande de brevet EP 0 844 005 divulgue que l'humidité résiduelle du produit biologique desséché à 25 traiter est l'élément critique dans l'efficacité de l'inactivation virale par un procédé de chauffage à sec à 80°C, pendant 72-77h. Les virus testés sont le VHA, le parvovirus porcin et le pseudorabies virus. Les inventeurs ont montré que l'humidité résiduelle doit être supérieure ou égale à 0,8% pour atteindre un facteur de réduction virale ≥ 4 log<sub>10</sub> avec ce procédé. Pour une humidité résiduelle ≤ 0,8%, le facteur de réduction virale est de 0,12 log<sub>10</sub> en moyenne.

35 PROBLEME TECHNIQUE

Il apparaît, au vu de ces résultats très dispersés, qu'aucun paramètre n'a été défini dont la mesure

permettrait de déterminer de manière sûre les variables opératoires caractéristiques d'un procédé d'inactivation virale par chauffage à sec à utiliser en fonction du produit biologique à traiter.

- 5 Il semble toutefois qu'il existe un certain consensus entre les auteurs sur le fait que le taux d'humidité du produit à traiter joue un rôle très important sans toutefois que ceux-ci soient d'accord sur un taux d'humidité résiduelle en tant que valeur seuil pour  
10 obtenir une inactivation virale satisfaisante. En effet, il suffit parfois que cette valeur baisse de quelques dixièmes pour que l'inactivation soit incomplète.
- 15 Cependant, contrairement à ce que pourraient laisser penser certains auteurs, le Demandeur a montré qu'une inactivation virale est possible dans des lyophilisats d'humidité résiduelle faible. Un fibrinogène humain cryodesséché d'humidité résiduelle égale à 0,1% a  
20 ainsi été chauffé à sec à 77°C pendant 72 h. Les facteurs de réduction des virus de l'hépatite A (VHA), du virus de l'immunodéficience humain (VIH), du virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et du parvovirus porcin (PPV) sont présentés dans le Tableau 1.

25

Tableau 1 :

Virus	Facteur de réduction
VHA	4,10 ± 0,3 3,75 ± 0,26
VIH	4,53 ± 0,36 4,62 ± 0,30 4,88 ± 0,28
BVDV	5,96 ± 0,40 5,21 ± 0,38
PPV	2,97 ± 0,43 2,88 ± 0,37

La dispersion de l'ensemble de ces observations ne permet donc que de tirer la conclusion suivante : l'humidité résiduelle du produit à traiter n'est donc pas le facteur déterminant des résultats de l'inactivation virale par chauffage à sec mais un facteur important dont dépendrait le facteur déterminant.

Le problème est donc de déterminer le paramètre physico-chimique multi-factoriel mesurable donnant une valeur seuil de part et d'autre de laquelle l'inactivation virale sera satisfaisante ou insatisfaisante.

#### RESUME DE L'INVENTION

15

Le Demandeur a identifié, de façon surprenante, que ce paramètre physico-chimique mesurable est la température de transition vitreuse du produit biologique à traiter.

20

La transition vitreuse est une transition du second ordre c'est-à-dire une transition thermique qui implique un changement de capacité calorifique, mais pas de chaleur latente. Elle est caractéristique des liquides surfondus qui sont refroidis à une température suffisamment basse suffisamment rapidement sans cristalliser et qui deviennent un verre et des polymères amorphes ou de la partie amorphe des polymères cristallins qui passent d'un état dur et fragile à un état mou et souple.

25

La température de transition vitreuse ou  $T_g$  est la température à laquelle a lieu la transition vitreuse. Quand un polymère est refroidi en-dessous de cette température il devient dur et fragile, comme le verre, on dit qu'il est à l'état vitreux.

30

Les caoutchoucs élastomères comme le polyisoprène et le polyisobutylène, sont utilisés au-dessus de leur température de transition vitreuse, c'est-à-dire à l'état caoutchouteux et ils sont mous et flexibles.

La température de transition vitreuse est connue de l'homme du métier comme dépendante de certains paramètres. Dans le cas des polymères, elle dépend de 5 la masse moléculaire, de la structure chimique de la chaîne, de la quantité de plastifiants.

Les plastifiants sont des petites molécules, comme les sels, qui s'insinuent entre les molécules de polymères et leur permettent de mieux glisser entre elles donc 10 facilitent leur mouvement. L'ajout de plastifiant permet donc d'abaisser la température de transition vitreuse.

Au contraire les molécules de poids moléculaire élevé bloquent les mouvements des molécules de polymère 15 entre elles et augmentent la température de transition vitreuse.

Par ailleurs, le Demandeur a montré que la température de transition vitreuse est directement corrélée à l'humidité résiduelle d'un lyophilisat de Facteur Von 20 Willebrand (FvW) donné.

La corrélation entre la température de transition vitreuse du lyophilisat et son humidité résiduelle est présentée sous forme de graphique à la Figure 1.

La température de transition vitreuse d'un produit 25 biologique dépend donc de la nature du principe actif, de la nature des excipients : plastifiants ou non, forme cristalline ou forme amorphe, de la masse moléculaire des excipients et de l'humidité résiduelle du produit biologique.

30

#### DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

L'invention concerne un procédé d'inactivation virale par chauffage à sec d'un virus présent ou 35 potentiellement présent dans un produit biologique séché, caractérisé par les étapes suivantes :

- a) déterminer la température de transition vitreuse Tg du produit biologique séché à traiter puis,

b) chauffer le produit biologique séché à traiter de l'étape a) à une température de chauffage à sec T supérieure ou égale à la température de transition vitreuse Tg déterminée à l'étape a).

5

Un produit séché est un produit ayant subi une méthode de dessication connue de l'homme du métier comme la lyophilisation, le séchage sous vide, la pervaporation, l'atomisation.

10 En particulier, un produit séché est un produit cryodesséché c'est-à-dire un produit tout d'abord congelé dont une partie de l'eau est ensuite sublimée sous vide.

15 En effet, le Demandeur a observé que le facteur de réduction virale et la cinétique d'inactivation virale sont favorisés lorsque la température de chauffage est supérieure ou égale à Tg.

La valeur de la température de transition vitreuse 20 permet donc de prédire si un procédé d'inactivation sera satisfaisant et de le modifier dans ce sens.

La mesure de la température de transition vitreuse d'un produit biologique séché consiste à soumettre un 25 échantillon de ce produit à une augmentation progressive et programmée de la température entre -50°C et +100°C et à observer ses changements d'état, dont la transition vitreuse.

On obtient ainsi le thermogramme du produit biologique 30 séché et notamment sa température de transition vitreuse.

Après avoir mesuré la température de transition vitreuse, selon ses connaissances générales dans le domaine de l'inactivation virale par chauffage, 35 l'homme du métier sait juger si pour satisfaire à l'exigence  $T \geq Tg$  :

- Tg est satisfaisante selon le virus concerné pour choisir une température  $T \geq Tg$

- 10 -

- ou bien si  $T_g$  doit être ajustée pour choisir  $T$  afin que l'inactivation virale et la stabilité du produit recherchées soient satisfaites.

Par exemple, si l'homme du métier sait que  $T_g$  est trop faible pour que le virus en question puisse être inactivé à  $T$  de sorte que  $T_g \leq T$  et que le produit reste stable, alors il augmentera  $T_g$  pour que  $T$  se situe dans une gamme de température qu'il sait pouvoir inactiver ce virus et que l'écart entre  $T$  et  $T_g$  ne soit pas assez important pour que le produit se dégrade.

Par contre, si l'homme du métier sait que  $T_g$  est trop élevée pour que  $T \geq T_g$  et que le produit reste stable alors il diminuera  $T_g$  avant de choisir  $T$ .

15

Le procédé d'inactivation virale par chauffage à sec dans un produit biologique selon l'invention est particulièrement approprié dans le cas d'un virus non-enveloppé.

20

Ce procédé peut permettre de traiter une composition contenant une ou plusieurs protéines extraites du plasma sanguin en tant que produit biologique séché.

Dans un mode de réalisation particulier, la 25 température de chauffage à sec  $T$  est choisie pour permettre l'inactivation d'un virus non-enveloppé.

De manière préférée, la température de transition vitreuse est augmentée par ajout d'excipients de masse moléculaire élevée au produit biologique ou par diminution de l'humidité du produit biologique ou bien elle est diminuée par ajout de sels ou d'excipients de faible masse moléculaire au produit biologique ou par augmentation de l'humidité du produit biologique.

35

En particulier, la température de transition vitreuse est mesurée au moyen d'un thermoanalyseur différentiel à balayage. Les changements d'état sont définis par un

changement de capacité calorifique mesurée par rapport à un produit inerte qui ne subit pas de transformation dans la plage de température considérée.

- 5 On préférera que la température de chauffage T du procédé selon l'invention soit comprise entre  $T_g$  et  $T_g + 20^\circ\text{C}$  pour conserver une stabilité du produit satisfaisante. Dans cet intervalle, on pourra soit choisir T de manière à accroître l'écart entre  $T_g$  et T
- 10 dans la limite de  $T_g + 20^\circ\text{C}$ , pour favoriser le facteur de réduction virale et la cinétique d'inactivation virale, soit choisir T de manière à diminuer l'écart entre  $T_g$  et T, pour favoriser la stabilité du produit.
- 15 De manière particulièrement préférée, la température de chauffage à sec T est choisie pour permettre l'obtention d'un facteur de réduction virale  $\geq 3 \log_{10}$ , de préférence  $\geq 4 \log_{10}$ .
- Dans un mode de réalisation particulier, dans une
- 20 étape finale, on mesure l'efficacité de l'inactivation virale dans le produit biologique séché traité et, si ladite efficacité est jugée insuffisante, l'inactivation virale de produit biologique séché se poursuit après accroissement d'un écart entre la température de chauffage T et la température de transition vitreuse  $T_g$ .
- Dans un autre mode de réalisation particulier, dans une étape finale, on évalue la stabilité du produit
- 25 biologique séché traité et, si ladite stabilité est jugée insuffisante, l'inactivation virale de produit biologique séché se poursuit après une diminution d'un écart entre la température de chauffage T et la température de transition vitreuse  $T_g$ .

35 Figures

Figure 1 : corrélation  $T_g/\text{HR}$ ,  $T_g$  = température de transition vitreuse et HR = humidité résiduelle

Figure 2 : facteur de réduction de PR772 par chauffage  
à sec à 62°C en fonction de Tg

Figure 3 : facteur de réduction de PR772 par chauffage  
à sec à 80°C en fonction de Tg

5 Figure 4 : facteur de réduction de PPV par chauffage à  
sec à 80°C en fonction de Tg

Figure 5 : facteur de réduction de PPV, HAV, BVDV,  
PR772, Phi174 à T = Tg = 80°C

Figure 6 : facteur de réduction de PPV, HAV, BVDV,  
10 PR772, Phi174 à T = Tg = 62°C

#### Exemples

Exemple 1 : Inactivation du bactériophage PR772 par  
chauffage à sec dans des lyophilisats :

15 Les caractéristiques physiques des lyophilisats sont  
modifiées afin de faire varier la température de  
transition vitreuse (Tg).

La température de transition vitreuse est déterminée  
par un thermoanalyseur différentiel à balayage. La  
température du thermoanalyseur différentiel à balayage  
est calibrée à l'aide de l'indium ( $T_m$  156,6°C) et du  
n-octadécane ( $T_m$  28,2°C). Les échantillons subissent  
des températures de -50°C à 130°C à la vitesse de  
20°C/min. L'azote liquide est utilisé pour mener les  
25 expériences à une température inférieure à la  
température ambiante. La température de transition  
vitreuse est prise au point médian du changement  
endothermique dans la chaleur spécifique apparente.  
Deux mesures sont réalisées et leur moyenne donne la  
30 Tg.

Le chauffage est effectué à une température inférieure  
à Tg, soit à l'état solide vitreux, ou à une  
température supérieure à Tg d'environ 20°C, soit à  
l'état viscoélastique (caoutchouteux).

35 Tous les lyophilisats présentent une teneur en eau  
inférieure à 1%.

La teneur en eau est déterminée par la méthode de  
Karl-Fischer, bien connue de l'homme du métier, basée

sur la réaction entre l'eau et l'iode.

Formulation du produit A (pH 7,0 ± 0,5) :

- glycine 7,5g/l  
5 - lysine HCl 5,5 g/l  
- CaCl<sub>2</sub> 0,15 g/l  
- mannitol 40 g/l  
- saccharose 50 g/l  
- FVIII 100 UI/ml  
10 Le produit A présente une Tg de 62°C.  
Le produit B présente la même formulation que le produit A à laquelle on a ajouté du NaCl. Ceci a permis de diminuer la Tg à environ 40°C (l'humidité résiduelle HR reste inchangée).  
15 C est un concentré de FvW cryodesséché et D est un fibrinogène humain cryodesséché.

Formulation du produit C (pH 7,0 ± 0,5) :

- citrate trisodique 10mM  
20 - CaCl<sub>2</sub> 1 mM  
- glycine 5 g/l  
- arginine HCl 40 g/l  
- albumine 10 g/l  
- FvW 100 UI/ml  
25

Formulation du produit D (6,8 < pH < 7,2) :

- fibrinogène 11 à 20 g/l  
- chlorhydrate d'arginine 40 g/l  
- isoleucine 10 g/l  
30 - glycine 2 g/l  
- monochlorhydrate de lysine 2 g/l  
- tri-sodium citrate 2 H<sub>2</sub>O 2,5 g/l

Les produits C et D présentent des Tg respectivement de 80°C et 90°C.

On mesure le facteur de réduction du bactériophage PR772 à 12, 24 et 72h pour un chauffage à 62 et 80°C.

Le titre viral est calculé selon la formule de Spearman Kärber tel que décrit dans the Federal Gazette n°84, 4 mai 1994 et dans Schmidt, N.J. et Emmons, R.W. (1989) dans Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection, 6<sup>ème</sup> Edition.

Le facteur de réduction est le résultat du rapport entre le titre viral/ml avant le traitement par chauffage à sec et le titre viral/ml après le traitement par chauffage à sec.

Les résultats sont représentés par les graphiques des figures 2 et 3.

On peut observer que :

- pour un chauffage à  $T = 80^\circ\text{C}$ ,
  - 1. du produit A dont  $\text{Tg} = 62^\circ\text{C}$  ( $T-\text{Tg} \approx 20^\circ\text{C}$ ), la cinétique d'inactivation est très rapide et le facteur de réduction atteint  $4 \log_{10}$  en moins de 24 heures
  - 2. du produit C dont  $\text{Tg} = T$ , le facteur de réduction atteint  $4 \log_{10}$  au bout de 72 heures
  - 3. du produit D dont  $\text{Tg} = 90^\circ\text{C}$ , le facteur de réduction est inférieur à  $4 \log_{10}$  au bout de 72 heures
- pour un chauffage à  $62^\circ\text{C}$ ,
  - 1. du produit A dont  $\text{Tg} = T$ , le facteur de réduction atteint  $4 \log_{10}$  au bout de 72 heures
  - 2. du produit B dont  $\text{Tg} = 40^\circ\text{C}$  ( $T-\text{Tg} \approx 20^\circ\text{C}$ ), la cinétique d'inactivation est très rapide et le facteur de réduction atteint  $4 \log_{10}$  en moins de 24 heures

35 Exemple 2 : Inactivation du PPV par chauffage à sec dans des lyophilisats :

On mesure le facteur de réduction du PPV à 12, 24 et 72h pour un chauffage à  $80^\circ\text{C}$  dans des lyophilisats de

Tg = 80 ou 90°C.

Les résultats sont représentés par le graphique de la Figure 4.

On peut observer que pour un chauffage à T = 80°C,

- 5        - à Tg = T, le facteur de réduction est proche de 4 log<sub>10</sub>,
- à T < Tg, le facteur de réduction est faible, de l'ordre de 2 log<sub>10</sub>.

10      Exemple 3 : Inactivation de PPV, HAV, BVDV, PR772 et Phi174 par chauffage à sec à T = Tg dans des lyophilisats :

15      On mesure le facteur de réduction de PPV, HAV, BVDV, PR772 et du bactériophage Phi174 à 12, 24 et 72h pour un chauffage à T = Tg = 80°C (dans un lyophilisat de Tg = 80°C) ou à T = Tg = 62°C (dans un lyophilisat de Tg = 62°C).

Les résultats sont représentés par les graphiques des figures 5 et 6.

20      On peut observer que, pour des virus peu résistants : HAV, BVDV, Phi174, un chauffage à T = Tg est suffisant pour atteindre un facteur de réduction de 4 log<sub>10</sub> dès 24 heures.

25      Par contre, pour des virus plus résistants : PPV et PR772, le temps de chauffage doit être prolongé à 72 heures pour atteindre un facteur de réduction proche de 4 log<sub>10</sub>.

30      Par conséquent, pour ces virus plus résistants, le but étant de les inactiver, on peut favoriser le facteur de réduction virale et la vitesse d'inactivation virale en augmentant la température de chauffage T ou en abaissant la Tg du produit afin d'accroître l'écart entre T et Tg.

35      Par ailleurs, on préférera soit le domaine T-Tg ≥ 20°C pour favoriser plutôt la vitesse de l'inactivation virale, soit le domaine T-Tg ≤ 20°C pour favoriser plutôt la stabilité du produit.

Exemple 4 : Impact du chauffage à 80°C, 72h sur les caractéristiques physico-chimiques d'un lyophilisat de FvW en fonction de sa température de transition vitreuse :

- 5 Trois lyophilisats de FvW caractérisés par trois températures de transition vitreuse différentes ont été chauffés à 80°C pendant 72 h. Différents paramètres : l'aspect du lyophilisat, son temps de dissolution et l'aspect de la solution ainsi obtenue 10 ont alors été observés.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 :

15

% HR	0,9	1,7	3,1
Tg (°C)	74	66	42
FvW : Rco (UI/ml)	140	120	105
Aspect du lyophilisat	normal	Légèrement rétracté	Très rétracté
Temps de dissolution (s)	15	35	75
Aspect de la solution	limpide	limpide	limpide

On observe qu'un chauffage à une température  $T \geq T_g$  et  $T-T_g \leq 20^\circ\text{C}$  permet de conserver une stabilité satisfaisante du produit bien que la température choisie permette un changement d'état de l'état vitreux vers l'état caoutchouteux.

On observe également qu'un écart trop important entre la température de chauffage et  $T_g$ , ici  $38^\circ\text{C}$ , est défavorable à la stabilité du produit.

25 Par conséquent, plus on choisit  $T$  proche de  $T_g$ , plus on favorise la stabilité du produit.

## REVENDICATIONS

1. Procédé d'inactivation virale par chauffage à sec d'un virus présent ou potentiellement présent dans un produit biologique séché, caractérisé par les étapes suivantes :

- a. déterminer la température de transition vitreuse  $T_g$  du produit biologique séché à traiter puis,
- b. chauffer le produit biologique séché à traiter de l'étape a) à une température de chauffage à sec  $T$  supérieure ou égale à la température de transition vitreuse  $T_g$  déterminée à l'étape a.

15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la température de transition vitreuse  $T_g$  du produit biologique séché est ajustée préalablement à la mise en œuvre du chauffage à sec.

20 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le produit biologique séché est un lyophilisat.

25 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le produit biologique séché est une composition contenant une ou plusieurs protéines extraites du plasma sanguin.

30 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la température de chauffage à sec  $T$  est choisie pour permettre l'inactivation d'un virus non-enveloppé.

35 6. Procédé selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la température de transition vitreuse est augmentée par

ajout d'excipients de masse moléculaire élevée au produit biologique ou par diminution de l'humidité du produit biologique.

5                   7. Procédé selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la température de transition vitreuse est diminuée par ajout de sels ou d'excipients de faible masse moléculaire au produit biologique ou par augmentation  
10                 de l'humidité du produit biologique.

15                 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que Tg est mesurée grâce à un thermoanalyseur différentiel à balayage.

20                 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que T est comprise entre Tg et Tg + 20°C.

25                 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la température de chauffage à sec T est choisie pour permettre l'obtention d'un facteur de réduction virale  $\geq 3 \log_{10}$ .

30                 11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la température de chauffage à sec T est choisie pour permettre l'obtention d'un facteur de réduction virale  $\geq 4 \log_{10}$

35                 12. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'on choisit T de manière à accroître l'écart entre Tg et T dans la limite de Tg +20°C pour favoriser le facteur de réduction virale et la vitesse d'inactivation virale.

13. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'on choisit T de manière à diminuer l'écart entre Tg et T pour favoriser la stabilité du produit.

5

14. Procédé selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisé par le fait que dans une étape finale, on mesure l'efficacité de l'inactivation virale dans le produit biologique séché traité et, si ladite efficacité est jugée insuffisante, l'inactivation virale du produit biologique séché se poursuit selon l'une des revendications 9 à 11, après accroissement de l'écart entre ladite température de chauffage T et ladite température de transition vitreuse Tg.

15. Procédé selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisé par le fait que dans une étape finale, on évalue la stabilité du produit biologique séché traité et, si ladite stabilité est jugée insuffisante, l'inactivation virale du produit biologique séché se poursuit selon l'une des revendications 9 à 11, après une diminution de l'écart entre ladite température de chauffage T et ladite température de transition vitreuse Tg.

1/4

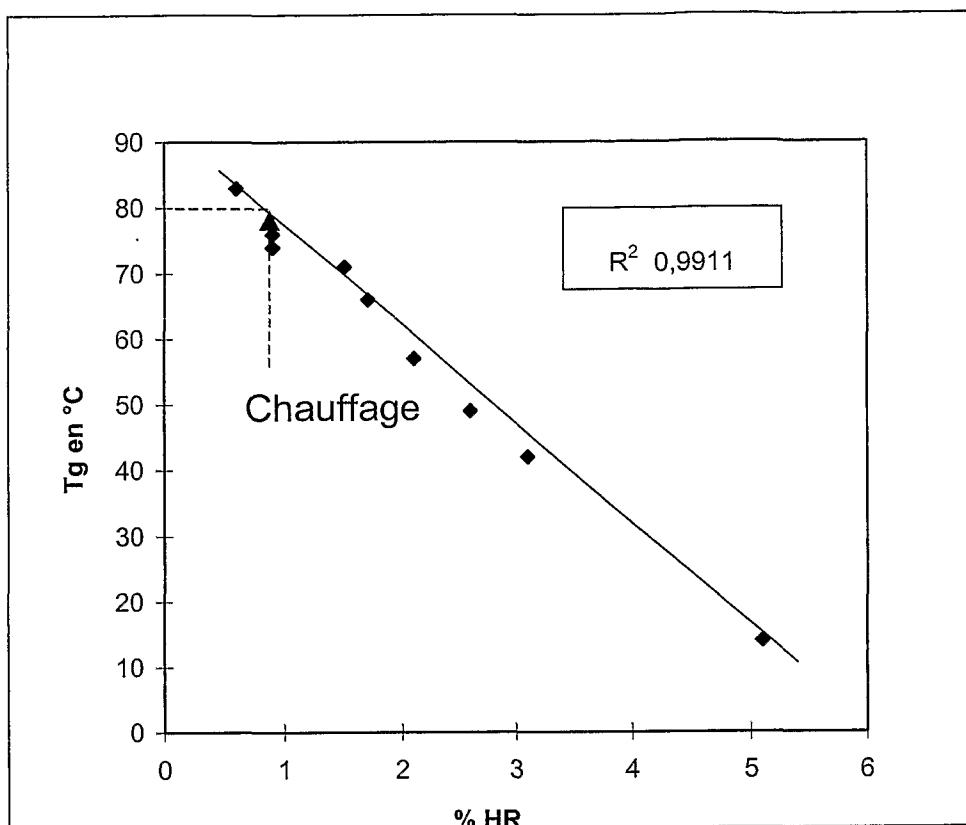


Figure 1 : Corrélation Tg / Humidité résiduelle

Fig. 1

2/4

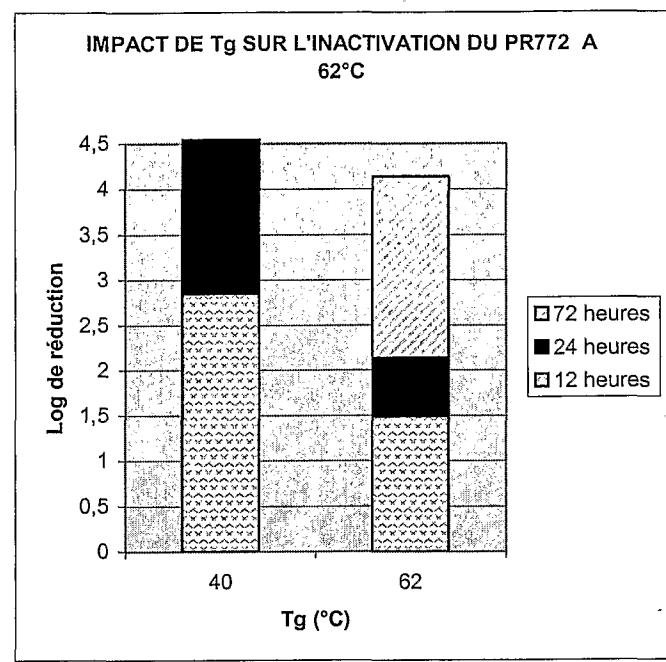


Fig. 2

3/4

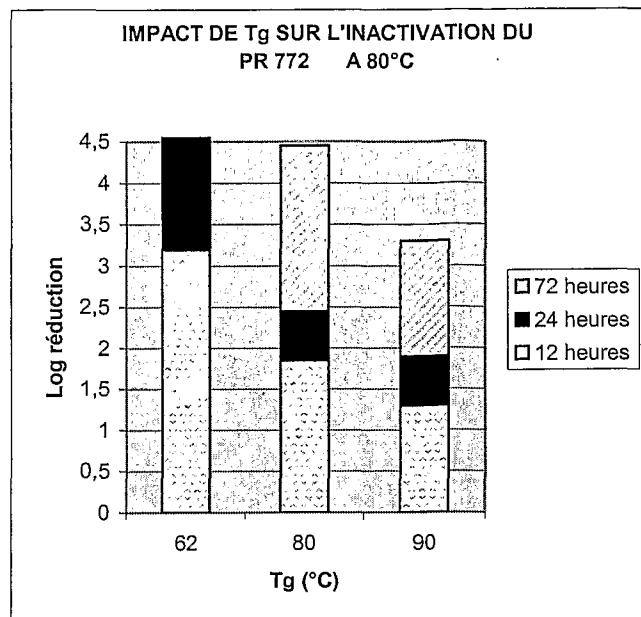


Fig. 3

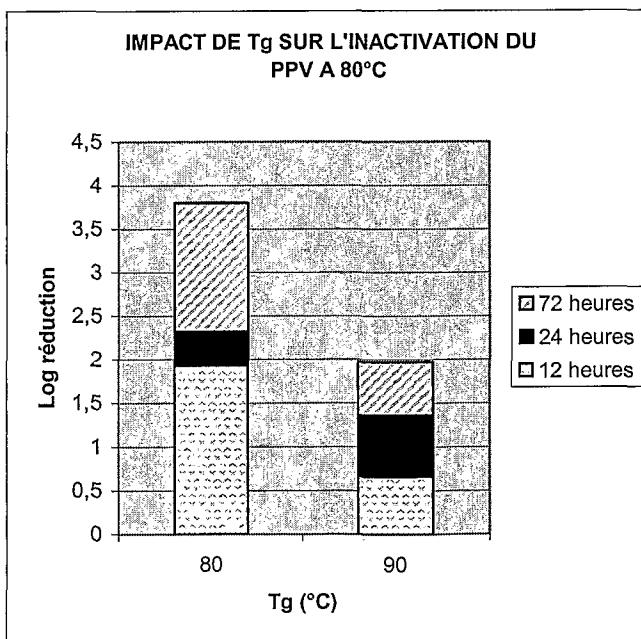


Fig. 4

4/4

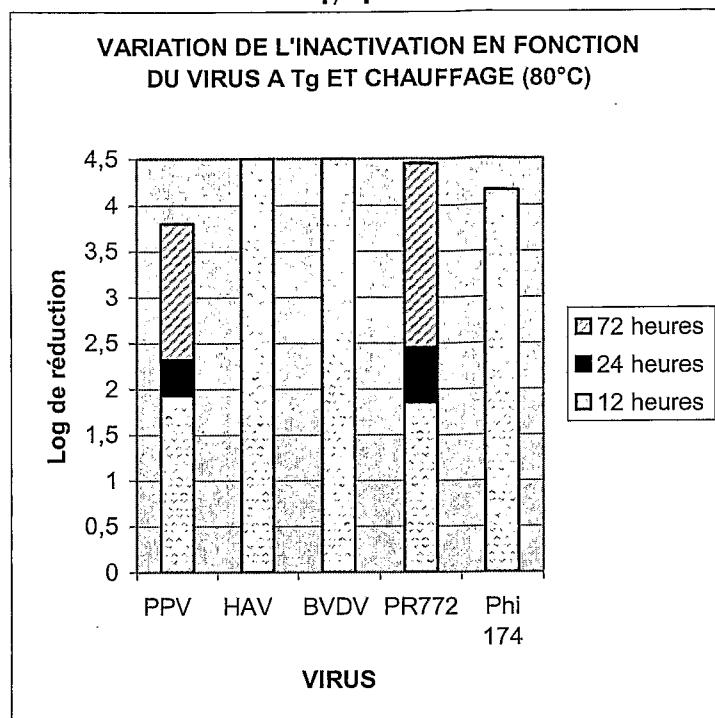


Fig. 5

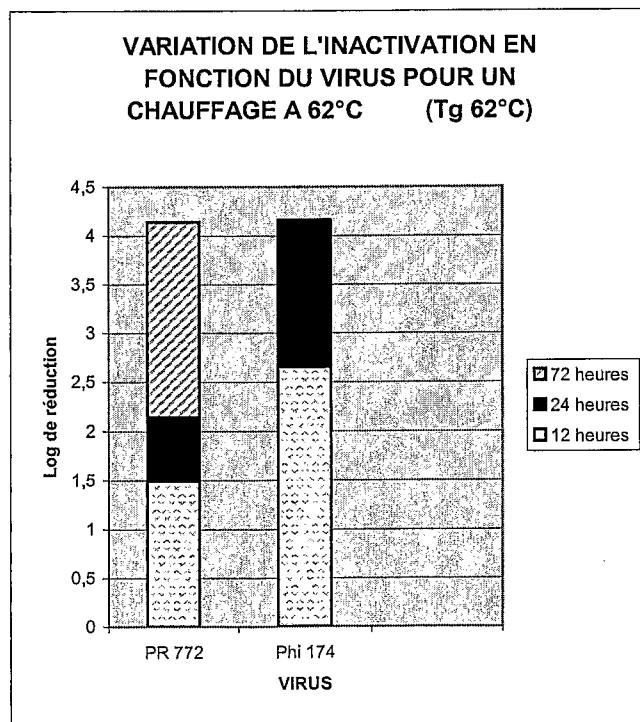


Fig. 6