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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
20 janvier 2005 (20.01.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/004901 A1

(51) Classification internationale des brevets[7] :
A61K 38/36, 38/37, 47/18, 47/12, A61L 2/00, C07K 14/75

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/001788

(22) Date de dépôt international : 8 juillet 2004 (08.07.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
03/08403 9 juillet 2003 (09.07.2003) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **LOBORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES** [FR/FR]; 3, avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **BARDAT, Annie** [FR/FR]; 3, allée des Diziaux, F-91470 Limours (FR). **BEGIN, Edith** [FR/FR]; 7, résidence de Vaucouleur, F-91940 Les Ulis (FR).

(74) Mandataire : **LEPEUDRY, Thérèse**; 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, IT, LU, 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 :
— *avec rapport de recherche internationale*
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

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.

(54) Title: METHOD FOR STABILIZING A CRYOPRECIPITATE OF PLASMATIC PROTEINS FOR BEING SUBJECTED TO A VIRAL INACTIVATION THERMAL TREATMENT

(54) Titre : PROCEDE DE STABILISATION D'UN CRYOPRECIPITE DE PROTEINES PLASMATIQUES DESTINE A ETRE SOUMIS A UN TRAITEMENT THERMIQUE D'INACTIVATION VIRALE

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining cryoprecipitatable proteins, comprising a viral inactivation step by thermally treating a lyophilisate of these proteins, comprising, before rendering the proteins in the form of a lyophilisate, an initial addition step, to these proteins, of a stabilizing and solubilizing formulation containing a mixture consisting of arginine, at least one hydrophobic amino acid and of tribasic sodium citrate. The invention also relates to a concentrate consisting of at least one cryoprecipitable protein containing the stabilizing and solubilizing formulation introduced according to the method and being suited for therapeutic use.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé d'obtention de protéines cryoprécipitables, comprenant une étape d'inactivation virale par traitement thermique d'un lyophilisat desdites protéines, comportant, avant la mise des protéines sous la forme de lyophilisat, une étape initiale d'ajout, auxdites protéines, d'une formulation stabilisante et solubilisante comprenant un mélange d'arginine, d'au moins un acide aminé hydrophobe et de citrate trisodique. L'invention concerne également un concentré d'au moins une protéine cryoprécipitable comprenant la formulation stabilisante et solubilisante introduite selon le procédé et susceptible d'être destiné à un usage thérapeutique.

WO 2005/004901 A1

PROCEDE DE STABILISATION D'UN CRYOPRECIPITE DE PROTEINES PLASMATIQUES DESTINE A ETRE SOUMIS A UN TRAITEMENT THERMIQUE D'INACTIVATION VIRALE

La présente invention concerne un procédé d'obtention de protéines cryoprécipitables issues du plasma sanguin, en général par cryoprécipitation ou par précipitation alcoolique à froid, faisant intervenir une étape de lyophilisation et une étape ultérieure d'inactivation virale par traitement thermique du lyophilisat, comprenant une étape d'ajout d'une formulation stabilisante et solubilisante permettant une lyophilisation de compositions liquides dedites protéines et une remise en solution aisée des formes lyophilisées après traitement thermique d'inactivation virale. Dans le cadre de l'invention, le terme "protéine" recouvre la protéine en tant que telle et également les concentrés et les fractions, contenant une telle protéine, notamment à usage thérapeutique, seule ou en mélange avec d'autres telles protéines. Ces concentrés et fractions sont obtenus par des méthodes de fractionnement du plasma humain ou animal connues dans l'art antérieur. Egalement, la locution "composition liquide de protéines cryoprécipitables" signifie une composition liquide comprenant au moins une protéine caractérisée par son insolubilité à froid lors de la décongélation d'un plasma humain ou animal congelé, ou bien par son insolubilité lors d'une précipitation par l'ajout au plasma d'un solvant organique, tel que l'éthanol, à froid.

L'utilisation de produits thérapeutiques issus du plasma humain, tels que les facteurs de la coagulation, à des fins thérapeutiques, notamment dans le cas de troubles hémorragiques héréditaires tels que l'hémophilie, peut être grandement compromise par le risque considérable que présente pour le patient hémophile la présence de virus dans les produits sanguins. Malgré la sélection rigoureuse de donneurs individuels, il persiste un risque de transmission

de divers virus notamment ceux de l'hépatite et du SIDA et des virus inconnus à ce jour et pouvant se révéler transmissibles par les produits sanguins.

Par conséquent, la transmission virale doit être évitée par des traitements adéquats des différentes fractions purifiées issues du plasma des donneurs et destinées à un usage thérapeutique. A ce titre, diverses méthodes d'inactivation ou d'élimination virale appliquées à diverses fractions protéiniques issues du plasma sanguin sont bien connues. On peut citer, par exemple, leurs traitements par solvant-détergent, ultrafiltration et nanofiltration, par pasteurisation ou par chauffage prolongé. Dans le cas du traitement par chauffage prolongé, celui-ci ne s'applique habituellement qu'à des fractions de protéines du plasma préalablement lyophilisées tout en nécessitant des températures de chauffage d'au moins 70°C sur des laps de temps compris entre 50 et 100 heures pour une inactivation virale optimale. Cependant, sous de telles conditions sévères de traitement thermique, les protéines plasmatiques, fragiles et thermolabiles, subissent des dégradations, ce qui conduit à des diminutions importantes de leurs fonctions biologiques.

Afin de remédier à cet inconvénient, des excipients protecteurs et stabilisants de protéines plasmatiques sont préalablement ajoutés à des compositions protéiniques liquides avant lyophilisation afin de répondre à un double objectif conjoint. Le premier objectif répond à la nécessité d'une stabilisation d'une part des protéines considérées au cours de la lyophilisation et, d'autre part, des protéines lyophilisées lors du stockage et, le second objectif, correspond au besoin d'une protection des protéines lyophilisées au cours du traitement thermique d'inactivation virale.

Le brevet EP 0 094 611 décrit une méthode de chauffage de fractions protéiniques du plasma lyophilisées, le Facteur VIII ou le fibrinogène, consistant à soumettre le produit

sec à une température de chauffage de 60°C pendant 72 à 96 heures. Ce brevet ne fait mention d'aucune composition particulière d'excipients stabilisants au cours du traitement thermique.

Le brevet canadien 1 260 389 mentionne l'incorporation d'excipients, tels que des anions non polaires de masse moléculaire supérieure à 80, des sucres, des sucres réducteurs et des acides aminés notamment, dans des compositions liquides de protéines du plasma préalablement à la lyophilisation afin de leur conférer une stabilisation au chauffage à sec pendant environ 72 heures à 68°C. Cependant, l'association de sucres réducteurs avec des acides aminés conduit à des composés de Maillard dont les propriétés ne sont pas en faveur d'une bonne innocuité des protéines traitées (activité, immunogénécité, allergies etc.). Ce traitement nécessite d'opérer sous vide ou sous atmosphère inerte.

La plupart des excipients stabilisants peuvent se révéler protecteurs de fractions de protéines plasmatiques au cours du traitement thermique à sec de celles-ci, à des températures de l'ordre de 60°C-68°C pendant 30 à 96 heures (P. Thomas, British Journal of Haematology, 70, 1998, 393-395 et J.A. Levy *et al.*, The Lancet, June 22, 1985, 1456-1457). Toutefois, malgré une diminution du titre viral après un tel traitement dans ces conditions, il a été démontré que des infections telles que HIV, HBV, HBC et parvovirus B19 pouvaient néanmoins être transmises (P. Thomas cité ci-dessous). Pour leur élimination efficace, il a été proposé de chauffer les fractions de protéines plasmatiques lyophilisées à des températures plus élevées. Ainsi, S.J. Skidmore *et al.* (Journal of Medical Virology, 30, 1990, 50-52) ont montré qu'un traitement thermique de concentrés de Facteur VIII lyophilisés à une température de 80°C pendant 72 heures évite la transmission du virus HCV non-A et non-B. Le brevet US 5 831 027 décrit ainsi un procédé de traitement thermique d'une protéine lyophilisée issue du cryoprécipité

de plasma sanguin, le fibrinogène, à une température de 80°C pendant 72 heures permettant ainsi l'obtention du fibrinogène exempt d'éventuels virus tels que ceux de HBV, HBC ou le parvovirus B19. Les excipients stabilisants ajoutés pour protéger la composition de fibrinogène à la fois au cours de la lyophilisation et pendant le traitement thermique d'inactivation virale, comprennent le saccharose et/ou un acide aminé (arginine), le tampon Tris et le citrate de sodium. L. Wilkelman *et al.* (Virus Inactivation in Plasma Products., Curr.Stud Hematol Blood Transfus., Basel, Karger, 1989, N°56, 55-69) montrent également la nécessité d'ajout d'excipients au Facteur VIII préalablement à la lyophilisation et à un traitement thermique d'inactivation virale à 80°C pendant 72 heures. Les excipients décrits sont : NaCl, citrate de sodium, Tris, $CaCl_2$ et saccharose.

Par ailleurs, étant donné que les différentes protéines issues du fractionnement du plasma, ayant subi une lyophilisation et un traitement thermique d'inactivation virale, nécessitent une reconstitution dans un milieu adéquat avant leur utilisation clinique, celle-ci doit pouvoir être facilement mise en oeuvre sur un laps de temps relativement court selon les exigences préconisées par la Phamacopée Européenne. A cet égard, des études sur la stabilité thermique du Facteur VIII dans un cryoprécipité lyophilisé (J. Margolis *et al.*, The lancet, December 8, 1984, 1345) contenant, préalablement à la lyophilisation, un mélange d'acides aminés naturels approprié à une alimentation parentérale, la Synthamin 17% (Travenol Laboratories Ltd.), ont montré qu'un traitement à 80°C pendant 16 heures, entraînait non seulement une dégradation du Facteur VIII telle que son activité était nulle mais également une impossibilité de redissoudre le cryoprécipité après les opérations considérées. Le brevet US 5 399 670 décrit un procédé pour faciliter la solubilisation ou la reconstitution des compositions de complexe de Facteur VIII

lyophilisées avec de l'eau purifiée pour injection, comprenant une étape d'ajout d'arginine à une solution de Facteur VIII préalablement à sa lyophilisation. Ce brevet ne mentionne pas de traitement thermique d'inactivation virale. Il peut également être prévu, selon ce brevet, l'ajout d'histidine et d'albumine. Les excipients stabilisants mentionnés dans le brevet US 5 831 027 cité précédemment, sont également destinés à favoriser la dissolution du fibrinogène lyophilisé dans l'eau pure, préalablement à son usage thérapeutique.

Toutefois, le choix d'une formulation stabilisante est dicté par la spécificité des protéines plasmatiques. Ainsi, en référence à l'article de N. Heimburger *et al.* (Virus Inactivation in Plasma Products., Curr Stud Hematol Blood Transfus., Basel, Karger, 1989, N°56, 23-33), on considère habituellement qu'une formulation stabilisante spécifique ne peut convenir qu'à une fraction protéinique aux principes actifs donnés. Une difficulté supplémentaire apparaît dans le cas où des fractions protéiniques plus complexes sont envisagées, notamment celles où sont considérées toutes les protéines de la coagulation et de l'hémostase issues d'un fractionnement du plasma. Par ailleurs, les hydrates de carbone, notamment le saccharose, peuvent être utilisés efficacement comme excipients de stabilisation et de redissolution de fractions protéiniques du plasma, lorsqu'on se propose de lyophiliser les fractions considérées puis de les traiter par la chaleur à sec, bien qu'ayant un effet ralentisseur sur l'inactivation virale (N. Heimburger *et al.* cité ci-dessus). Par conséquent, les fractions protéiniques ainsi traitées peuvent ne pas être totalement exemptes de virus et leur utilisation sur le plan clinique s'en trouve restreinte. En outre, certains hydrates de carbone, comme le maltose ou le saccharose, ne peuvent être utilisés sans risques chez des sujets présentant des insuffisances rénales et/ou souffrant du diabète.

Par conséquent, compte tenu du besoin médical existant

pour certaines protéines responsables de la coagulation et de l'hémostase, en particulier les protéines cryoprécipitables, la Demanderesse a cherché à mettre au point une formulation simple, exempte d'hydrates de carbone et de tampon Tris, compatible avec un usage thérapeutique, qui, ajoutée à des compositions liquides de protéines cryoprécipitables, confère une bonne protection de tous les principes actifs considérés pendant et après la lyophilisation de celles-ci, d'une part, et, d'autre part, contre les chocs thermiques nécessaires à la destruction des virus et qui permet, en même temps, un temps de remise en solution réduit des formes lyophilisées de ces protéines.

A cette fin, considérant que l'ajout d'arginine à des compositions liquides de protéines cryoprécipitables offre un effet protecteur pendant et après la lyophilisation de celles-ci, tout en permettant la solubilisation de leurs formes lyophilisées mais sans assurer leur stabilité au traitement thermique d'inactivation virale, la Demanderesse a cherché différents composés, seuls ou en mélange, dont l'ajout à l'arginine offrirait une protection contre la dénaturation thermique. Ainsi, la Demanderesse a trouvé de façon surprenante que l'addition à l'arginine, acide aminé très hydrophile, d'au moins un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi parmi les plus hydrophobes selon Kyte *et al.* (J. Mol. Biol., 157, 105-132, 1982), et de citrate trisodique permettait la stabilisation des protéines cryoprécipitables pendant et après la lyophilisation, tout en améliorant de façon notable la solubilisation des formes lyophilisées après le traitement thermique d'inactivation virale.

Par conséquent, l'invention concerne un procédé d'obtention de protéines cryoprécipitables, comprenant une étape d'inactivation virale par traitement thermique d'un lyophilisat desdites protéines, caractérisé en ce qu'il comprend, avant la mise des protéines sous la forme de lyophilisat, une étape initiale d'ajout, auxdites protéines,

d'une formulation stabilisante et solubilisante comprenant un mélange d'arginine, d'au moins un acide aminé hydrophobe et de citrate trisodique.

Ainsi, l'ajout de la formulation stabilisante et solubilisante dans le procédé selon l'invention permet de conserver aux protéines cryoprécipitables à partir du plasma sanguin une activité biologique satisfaisante après lyophilisation et traitement thermique d'inactivation virale, même si celui-ci est sévère, et de présenter un temps de remise en solution réduit tout en préservant un caractère de limpidité à la solution du lyophilisat reconstitué. Cette formulation présente en outre l'avantage d'être simple, universelle et de pouvoir être aisément mise en oeuvre sur le plan industriel avec des gains de temps appréciables.

De préférence, la formulation stabilisante et solubilisante utilisée dans le procédé de l'invention est constituée du seul mélange d'arginine, d'au moins un acide aminé hydrophobe et de citrate trisodique. Une telle formulation exclusivement constituée de ces trois composés, présente particulièrement l'avantage d'associer une réduction des durées et des coûts de préparation à l'échelle industrielle grâce à la présence d'un nombre minimal mais efficace d'adjuvants.

Tout acide aminé hydrophobe (selon Kyte *et al.* cité ci-dessus), tel que la valine et la phénylalanine, convient dans le cadre de l'invention mais avantageusement le choix se porte sur la leucine, l'iso-leucine ou un mélange des deux.

La formulation stabilisante et solubilisante comprend également du citrate trisodique qui permet, d'une part, d'ajuster le pH des compositions liquides de protéines cryoprécipitables avant les traitements mentionnés ci-dessus et, d'autre part, d'accroître l'effet protecteur de celle-ci à condition d'en ajuster la concentration.

Enfin, la formulation stabilisante et solubilisante peut

en outre être additionnée de glycine et/ou de lysine.

Elle peut également, en tant que de besoin, être additionnée d'adjuvants stabilisants connus dans la technique.

Dans le contexte de l'invention, on peut ajouter la formulation stabilisante et solubilisante comprenant le mélange des trois composés d'intérêt à une composition liquide de protéines cryoprécipitables, ou les protéines cryoprécipitables peuvent être dissoutes dans une solution aqueuse de la formulation comprenant le mélange des trois composés d'intérêt.

Les concentrations des différents additifs envisagés pour la formulation stabilisante seront choisies par l'homme du métier de façon à obtenir l'effet de stabilisation voulu. Avantageusement, les concentrations en chacun des additifs, par litre de compositions liquides de protéines cryoprécipitables, sont les suivantes :

- arginine, de 25 à 50 g/l et de préférence de 35 à 45 g/l (en référence au brevet US 5 399 670);
- citrate trisodique, de 0,5 à environ 12 g/l ;
- leucine, isoleucine ou leur mélange, de 5 à 15 g/l et de préférence de 9 à 11 g/l ; et
- glycine et/ou lysine, chacune de 1 à 5 g/l et de préférence chacune de 1,5 à 2,5 g/l.

Dans le cadre de l'invention, la lyophilisation de compositions liquides de protéines préalablement congelées est effectuée selon des méthodes classiques utilisant des dispositifs habituels, selon des conditions de mise en oeuvre connues de l'homme du métier. Avantageusement, la lyophilisation est effectuée à des températures comprises entre -40°C et -30°C pendant environ 48 heures.

Le traitement thermique d'inactivation virale est effectué de façon à inactiver efficacement les virus. Il est mis en oeuvre de préférence à des températures comprises entre 80°C et 90°C pendant 72 heures.

Bien que le traitement thermique d'inactivation virale permette l'obtention d'un lyophilisat exempt de virus, le procédé peut comprendre, préalablement à l'étape d'ajout de

la formulation stabilisante et solubilisante à une composition liquide de protéines cryoprécipitables, au moins une étape supplémentaire d'inactivation et/ou d'élimination des virus de ladite composition liquide par solvant-détergent et/ou par nanofiltration, par exemple sur des filtres de 35 nm, pour assurer au final une inactivation et une élimination totales et complètes des virus.

Ainsi, la mise en oeuvre du procédé conduit à des protéines cryoprécipitables lyophilisées et viralement inactivées, qui, une fois reconstituées dans un milieu liquide compatible sur le plan pharmaceutique, tel que l'eau pure pour injection, peuvent être injectées directement à un patient. Cette qualité thérapeutique des protéines cryoprécipitables est obtenue grâce à la formulation stabilisante et solubilisante qui rend possible tous les traitements mentionnés précédemment, notamment les traitements d'inactivation et d'élimination des virus, tout en conservant l'activité biologique de ces protéines cryoprécipitables traitées et les caractéristiques de dissolution du lyophilisat.

La formulation stabilisante et solubilisante utilisée selon le procédé de l'invention s'applique aux protéines cryoprécipitables, telles que le Facteur VIII, le Facteur von Willebrand, le Facteur XIII, le fibrinogène et la fibronectine, obtenues par des méthodes de fractionnement du plasma sanguin connues de l'homme du métier. La formulation stabilisante et solubilisante s'applique également aux différents concentrés de protéines semi-purifiés, obtenus par exemple par extraction/solubilisation en tampon Tris et adsorption sur gel d'alumine, tel que décrit par Wickerhauser *et al.* (Vox Sang., 35, 18-31, 1978). Un concentré ainsi obtenu, enrichi en Facteur VIII et Facteur von Willebrand, peut être chauffé selon les conditions décrites dans le brevet EP 0 094 611.

Cette formulation est également appropriée à la stabilisation et à la solubilisation des protéines purifiées ou des fractions enrichies en chacun des facteurs de la

coagulation telles qu'obtenues notamment après la mise en oeuvre de méthodes chromatographiques décrites, par exemple, dans le brevet EP 0 359 593, ayant été ensuite lyophilisées et ayant subi un traitement thermique d'inactivation virale. Par ailleurs, cette formulation est appropriée à la stabilisation du fibrinogène purifié obtenu à partir du cryoprécipité de plasma ou du plasma par précipitation alcoolique à froid, telle que décrite par Kistler *et al.* (Vox Sang., 7, 1962, 414-424). Il convient de noter que dans le contexte de l'invention, lors de la purification du fibrinogène à partir d'un cryoprécipité par toute technique de fractionnement connue de l'homme du métier, celui-ci est toujours accompagné d'une faible teneur en Facteur XIII (FXIII), non rédhibitoire pour son activité thérapeutique.

Ce procédé est particulièrement avantageux parce qu'il peut être appliqué à l'ensemble des protéines cryoprécipitables ou à au moins une protéine choisie parmi celles-ci et, en particulier, choisie parmi le Facteur VIII, le Facteur von Willebrand, le Facteur XIII, le fibrinogène et la fibronectine.

L'invention se rapporte également aux concentrés d'au moins une protéine cryoprécipitable, notamment à usage thérapeutique, comprenant la formulation stabilisante et solubilisante selon le procédé de l'invention.

Enfin, l'invention concerne une formulation stabilisante et solubilisante pour les protéines cryoprécipitables destinées à être soumises à une lyophilisation et à un traitement thermique d'inactivation virale comprenant un mélange d'arginine, d'au moins un acide aminé hydrophobe et de citrate trisodique. De préférence, la formulation stabilisante et solubilisante est constituée dudit mélange d'arginine, d'au moins un acide aminé hydrophobe et de citrate trisodique.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

Exemple 1

Un cryoprécipité, constitué en grande majorité de Facteur VIII, de facteur von Willebrand, de Facteur XIII, de fibrinogène et de fibronectine, a été remis en solution dans une formulation stabilisante et solubilisante de l'invention comprenant le mélange de composés donnés au Tableau 1 (Solution A). La concentration en protéines est d'environ 15 g/l.

Tableau 1 : composés et leurs concentrations (Solution A)

Composés	Concentration (g/l)
Arginine	40
Iso-leucine	10
Citrate trisodique	2,5
Lysine	2
Glycine	2

Après homogénéisation du mélange, la solution ainsi obtenue est filtrée sur des filtres de 0,45 µm et 5 ml sont prélevés et placés dans un flacon. La solution subit ensuite une lyophilisation à -30°C pendant 48 heures. On procède de façon identique avec une solution de référence comprenant le même cryoprécipité que le précédent mais qui a été remis en solution dans une formulation standard comprenant un mélange respectif de Tris (2,4 g/l), de citrate trisodique (5,88 g/l) et de NaCl (1,16 g/l) (Solution B).

Après la lyophilisation, les deux lyophilisats de cryoprécipité obtenus, à savoir l'un comprenant la formulation de l'invention et l'autre la formulation standard, sont remis en solution dans 5 ml d'eau pure pour injection (respectivement dénommées Solution A' et Solution B'). On procède alors à des expérimentations destinées à apprécier l'aptitude des formulations standard et celle de l'invention à protéger ou à stabiliser l'ensemble des protéines considérées durant la lyophilisation,

conjointement à solubiliser les formes lyophilisées obtenues. A cet effet, on évalue, pour chacune des Solutions A' et B', les trois paramètres suivants : l'aspect du lyophilisat avant redissolution, le temps de redissolution du lyophilisat dans l'eau purifiée pour injection et la turbidité de la solution ainsi obtenue, conjointement aux activités et aux quantités des différentes protéines par des méthodes connues de l'homme du métier. Les différents résultats des mesures sont présentés dans le Tableau 2 dans lequel les unités de volume sont relatives à la solution du produit lyophilisé reconstitué par 5 ml d'eau purifiée pour injection.

Tableau 2

	Solution A'	Solution B'
Aspect du lyophilisat sec	jaunâtre	jaunâtre, lyophilisat rétracté
Temps de redissolution (min)	6,58	10,72
Turbidité (NTU*)	18,1	29
Fibrinogène coagulable (g/l)	12,6	14,5
Fibrinogène pondéral (g/l)	11,6	11,2
Activité en Facteur VIII (UI/ml)	6,7	6,3
Activité en Facteur von Willebrand (FvW:RCo ; UI/ml)	8,1	8,1
Activité antigène en Facteur XIII (UI/ml)	1,51	1,24
Fibronectine (mg/ml)	5,85	5,52

*NTU : Normalized Turbidity Units

Les résultats obtenus montrent tout d'abord que l'ajout d'une formulation de l'invention (Solution A) aux protéines du cryoprécipité, par rapport à la formulation standard (Solution B), permet de réduire sensiblement le temps de redissolution du lyophilisat, de l'ordre de 40%. On observe également que la formulation A donne de meilleurs résultats sur le plan de la turbidité ce qui indique une présence diminuée, par rapport à la solution B, en produits de dégradation insolubles dans l'eau. Dans les deux cas, les Solutions A et B restituent globalement les mêmes quantités et activités des protéines considérées après lyophilisation.

Exemple 2

Les deux lyophilisats de protéines du cryoprécipité précédents, à savoir l'un comprenant la formulation de l'invention et l'autre la formulation standard, sont chauffés à sec pendant 72 heures à 80°C. Le lyophilisat chauffé des protéines du cryoprécipité comprenant une formulation de l'invention (Solution A) est remis en solution dans 5 ml d'eau pure pour injection (Solution A"). On observe que le lyophilisat chauffé des protéines du cryoprécipité comprenant la formulation standard (Solution B) ne peut être remis en solution. Cette impossibilité de redissolution s'explique par la présence de protéines dénaturées par la chaleur et insolubles, ce qui démontre que la solution B ne stabilise pas les protéines au cours du traitement thermique. Comme pour l'Exemple 1, on procède toutefois aux mêmes expérimentations destinées à apprécier l'aptitude de la formulation de l'invention à stabiliser et à solubiliser conjointement l'ensemble des protéines considérées après le traitement thermique d'inactivation virale effectué sur leurs formes lyophilisées de l'Exemple 1. Les différents résultats des mesures sont présentés dans le Tableau 3 dans lequel les unités de volume sont relatives à la solution du produit lyophilisé reconstitué par 5 ml d'eau purifiée pour injection.

Tableau 3

	Solution A"
Aspect du lyophilisat sec	jaune citron
Temps de redissolution (min)	3,73
Turbidité (NTU*)	18,3
Fibrinogène coagulable (g/l)	13,3
Fibrinogène pondéral (g/l)	11,7
Activité en Facteur VIII (UI/ml)	5,6
Activité en Facteur von Willebrand (FvW:RCo ; UI/ml)	6,0
Activité antigène en Facteur XIII (UI/ml)	1,86
Fibronectine (mg/ml)	5,93

*NTU : Normalized Turbidity Units

La comparaison des résultats des mesures obtenus pour les Solutions A' et A", extraits respectivement des Tableaux 1 et 2, montre de façon surprenante que la Solution A, formulation selon l'invention, permet une réduction très importante, d'environ 50%, du temps nécessaire à la redissolution des protéines traitées thermiquement par rapport à celui obtenu après lyophilisation, sans pertes notables de leurs fonctions biologiques.

Exemple 3

Un lot de fibrinogène, ayant été isolé et purifié à partir d'un cryoprécipité par la méthode de Kistler *et al.*, a été mis en solution à raison de 15 g/l dans une formulation témoin constituée d'un mélange de citrate trisodique (2,5 g/l), de lysine (2 g/l) et de glycine (2

g/l) (Solution C). On obtient ainsi une solution concentrée en fibrinogène. A cette solution, on ajoute divers acides aminés afin d'étudier leur influence sur le temps de redissolution du lyophilisat de fibrinogène avant et après chauffage. Les solutions obtenues, ainsi que les concentrations en acides aminés, sont indiquées au Tableau 4.

Tableau 4

Solution	Acide aminé (g/l)
C	-
C1	C + valine (5 g/l)
C2	C + leucine (5 g/l)
C3	C + arginine (10 g/l)
C4	C + isoleucine (10 g/l)
C5	C + Isoleucine (10 g/l) + arginine (10 g/l

Les differentes solutions (Solutions C à C5) sont ensuite filtrées et 10 ml de chaque solution sont soumis à une lyophilisation et au traitement thermique selon l'Exemple 1. Les lyophilisats respectifs sont repris dans 10 ml d'eau pure pour injection et on mesure le temps nécessaire pour une redissolution totale des lyophilisats. Les résultats sont présentés au Tableau 5.

Tableau 5

Solution	Temps de redissolution avant chauffage (min)	Temps de redissolution après chauffage (min)
C	32,66	61,50
C1	15,22	8,05
C2	16,3	22,93
C3	6,0	12,69
C4	11,25	10,75
C5	5,7	4,85

Les résultats montrent bien que la Solution C5 selon l'invention offre le temps de redissolution le plus court.

Afin de montrer également l'aptitude des solutions considérées à stabiliser le fibrinogène au cours de la lyophilisation et du chauffage des formes sèches, en fonction de la nature de l'acide aminé ajouté, on procéde à des mesures de turbidité des solutions précédentes reconstituées. Le Tableau 6 présente les mesures de la turbidité avant chauffage des lyophilisats des Solutions C à C5, de même qu'après chauffage de celles-ci.

Tableau 6

Solution	Turbidité avant chauffage (*NTU)	Turbidité après chauffage (*NTU)	Accroissement (%)
C	24,25	34,65	42,9
C1	18,04	22,83	26,6
C2	18,48	24,68	35,6
C3	15,44	18,80	21,8
C4	13,02	16,06	23,3
C5	10,98	11,88	8,2

(*NTU) : Normalized Turbidity Units

Les résultats indiquent de manière indubitable qu'une formulation de l'invention (Solution C5) présente la plus faible différence de turbidité des solutions reconstituées, avant et après chauffage, ce qui se traduit par un accroissement de seulement 8,2%, par rapport à la Solution C dont l'accroissement est de 42,9%.

Exemple 4

Les Solutions C, C3 à C5 de l'Exemple 3, contenant un autre lot de fibrinogène, sont lyophilisées et chauffées à 80°C pendant 72 heures. Les lyophilisats correspondant sont ensuite repris dans 10 ml d'eau pure pour injection et on

mesure les paramètres suivants : le temps de redissolution, la quantité en multimères non solubles, la turbidité, et la filtrabilité des solutions reconstituées par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier, la filtrabilité permet d'apprécier le degré de dénaturation d'une protéine, le fibrinogène dans le cas présent, sans toutefois définir le ou les facteur(s) de dénaturation qui peuvent être proportionnels à la quantité en particules, fibrilles ou multimères. De même, la teneur en multimères est également proportionnelle au degré de dénaturation du fibrinogène et est mesurée par électrophorèse (SDS Page). L'essai de filtrabilité consiste à mesurer le volume filtré récupéré d'une solution à travers un filtre à porosité suffisante pour assurer la stérilisation de la solution, soit de 0,20 ± 0,02 µm et de 25 mm de diamètre au moyen d'une seringue contenant 10 ml de la solution à étudier. Le volume filtré récupéré traduit l'importance du colmatage du filtre par les produits de dégradation. Ainsi, plus le volume récupéré est grand, moins le fibrinogène est dégradé. Les résultats des différentes mesures sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7

Solution	Filtrabilité (ml)	Temps de redissolution (min)	Quantité en multimères (%)	Turbidité (*NTU)
C	7	20	10	26
C3	10	20	10	21
C4	10	10	5	11
C5	10	4	< 3	11

(*NTU) : Normalized Turbidity Units

Les quatre paramètres analysés ci-dessus indiquent qu'une formulation de la présente invention (Solution C5)

est particulièrement adaptée à la stabilisation et à la redissolution du lyophilisat de fibrinogène chauffé. Le lyophilisat de fibrinogène reconstitué présente une filtrabilité rapportée à la surface du filtre d'environ 2 ml/cm^2.

Afin de démontrer les pouvoirs stabilisant et solubilisant de la Solution C5 selon l'invention vis-à-vis du fibrinogène même à des conditions sévères de traitement thermique, les Solutions C3 et C5 contenant un autre lot de fibrinogène, ont été lyophilisées et chauffées à 90°C pendant 72 heures. Hormis l'étude des quatre paramètres ci-dessus, on a procédé à des essais supplémentaires consistant à des mesures du taux de produits de dégradation du fibrinogène (PDF). Dans le cadre de cet exemple, les PDF (µg/ml) représentent des peptides de tailles diverses engendrés lors d'une dénaturation du fibrinogène. Plus cette valeur est importante, plus celui-ci apparaît dégradé et est susceptible de former par exemple des caillots. Les résultats des différentes mesures sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8

Solution	Filtrabilité (ml)	Temps de redissolution (min)	Quantité en multimères (%)	Turbidité (*NTU	PDF (µg/ml)
C3	≤ 6	10	10	16	750 à 1250
C5	10	10	10	11	625 à 750

Les résultats ci-dessus démontrent que malgré des conditions de chauffage très sévères, la formulation selon l'invention (Solution C5) permet encore de protéger et de

solubiliser le fibrinogène après une lyophilisation et un traitement thermique de 90°C pendant 72 heures, ce qui est révélé par de bonnes valeurs des paramètres étudiés. Le lyophilisat de fibrinogène reconstitué présente également une filtrabilité rapportée à la surface du filtre d'environ 2 ml/cm^2.

Exemple 5

Cet exemple traite de l'influence de la concentration en citrate trisodique contenu dans une formulation de l'invention (Solution A) sur la stabilisation et la solubilisation d'une solution de fibrinogène destinée à être lyophilisée et chauffée à 80°C pendant 72 heures. Un lot de fibrinogène, obtenu à partir d'un cryoprécipité, a été mis en solution à raison de 15 g/l et homogénéisé dans la Solution A dans laquelle on a fait ensuite varier la concentration en citrate trisodique d'une solution à l'autre. On a obtenu quatre solutions, notées respectivement Solutions A1, A2, A3 et A4, contenant respectivement 0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l et 11,2 g/l en citrate trisodique. Ces solutions sont ensuite filtrées comme précisé à l'Exemple 1 et 5 ml de chacune des solutions sont prélevés et placés dans un flacon. Les quatres solutions précédentes contenant le fibrinogène ont subi une lyophilisation et un traitement thermique indiqué à l'Exemple 1. Les quatre lyophilisats de fibrinogène non chauffés d'une part, et, d'autre part, chauffés sont ensuite remis en solution dans 5 ml d'eau pure pour injection pour donner les quatre solutions A1, A2, A3 et A4 précédentes. On procède à des expérimentations destinées à apprécier l'influence de la concentration en citrate trisodique de la formulation de l'invention sur l'aptitude de celle-ci à protéger le fibrinogène durant la lyophilisation et à le solubiliser après le chauffage des formes lyophilisées, ceci par rapport à ces solutions n'ayant subi aucune des opérations précédentes (solutions témoins correspondantes). A cet effet, on mesure, pour

chacune des Solutions A1, A2, A3 et A4, les paramètres suivants : le temps de redissolution du lyophilisat dans l'eau pure pour injection, la turbidité de la solution ainsi obtenue, les quantités en multimères insolubles, en fibrinogène pondéral et coagulant par des méthodes connues de l'homme du métier. Les différents résultats des mesures sont présentés dans le Tableau 9 dans lequel les unités de volume sont relatives à la solution du produit lyophilisé reconstitué par 5 ml d'eau purifiée pour injection.

Tableau 9

	Avant lyophilisation				Après lyophilisation				Après chauffage (80°C, 72 h)			
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
Quantité en multimères (%)	8,3	6,6	7,3	7,5	6,9	5,6	5,8	4,2	6,3	6,2	5,9	5,2
Turbidité *NTU	11,0	11,0	10,9	10,1	11,3	11,1	10,9	10,1	11,6	11,3	11,2	10,3
Fibrinogène coagulable (g/l)	17,3	17,2	17,3	16,3	14,9	14,3	14,6	14,2	14,9	14,9	15,2	15,2
Fibrinogène pondéral (g/l)	16,6	16,1	16,0	15,8	16,2	16,1	16,0	15,2	16,7	15,7	16,9	16,1
Temps de redissolution (mln)	-	-	-	-	5,50	10,87	6,37	10,03	10,35	9,83	11,55	9,95

*NTU : Normalized Turbidity Units

Les résultats obtenus montrent que le choix d'une concentration dans la plage de valeurs de 0,5 à environ 12 g/l en citrate trisodique contenue dans une des formulations de l'invention ci-dessus non seulement permet une stabilisation satisfaisante du fibrinogène au cours de la lyophilisation et du traitement thermique, par rapport aux solutions témoins, mais permet également de conserver des temps de redissolution globalement identiques du fibrinogène lyophilisé par rapport à celui chauffé à sec.

Exemple 6

Cet exemple traite de l'influence de la concentration en citrate trisodique contenu dans une formulation selon l'invention (Solution A) sur la stabilisation du Facteur XIII contenu dans une solution de fibrinogène destinée à être lyophilisée, d'une part, et, d'autre part, chauffée à 80°C pendant 72 heures. Ces deux protéines, ayant été obtenues à partir d'un cryoprécipité, ont été mises en solution à raison de 15 g/l (fibrinogène + Facteur XIII) et homogénéisées dans deux formulations selon l'invention (Exemple 1) contenant respectivement 2,5 g/l (Solution A) et 11,2 g/l (Solution A4) de citrate trisodique. Prélablement à la lyophilisation, les Solutions A et A4 ont subi les opérations décrites dans l'Exemple 1. Les deux lyophilisats de fibrinogène et de facteur XIII, d'une part, non chauffés et, d'autre part, chauffés sont ensuite remis en solution dans 5 ml d'eau purifiée pour injection pour donner les deux solutions A et A4 précédentes. On mesure respectivement l'activité en FXIII exprimées UI/ml (d'eau purifiée pour injection) et le FXIII-antigène en UI/ml ainsi que le rapport activité en FXIII:FXIII-antigène (noté R) selon des méthodes d'analyses classiques. Les différents résultats des mesures sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10

	Lyophilisat non chauffé			Lyophilisat chauffé		
	Activité FXIII (UI/ml)	FXIII antigène (UI/ml)	R	Activité FXIII (UI/ml)	FXIII antigène (UI/ml)	R
Sol. A	1,5	2,25	0,60	1,3	2,8	0,46
Sol. A4	9,9	8,22	1,2	8,6	8,15	1,06

Les résultats montrent une légère baisse du rapport R pour chacun des lyophilisats lorsque ceux-ci ont été traités thermiquement, par rapport aux lyophilisats non chauffés. Par ailleurs, on note que la diminution du rapport R est moins importante lorsque la teneur en citrate est plus élevée. Ce tableau révèle en outre que lorsqu'on augmente la concentration en citrate d'une solution par rapport à une autre, en l'occurrence les Solutions A et A4, et qu'on les lyophilise, le rapport R augmente également. On observe le même phénomène lorsque les lyophilisats sont chauffés. Par conséquent, la concentration en citrate influe sur la stabilisation du FXIII ce qui est notamment démontré par les valeurs des différentes activités.

Exemple 7

Dans cet exemple, on procède à la préparation des quatre solutions selon l'Exemple 5 qui sont reconstituées après lyophilisation et traitement thermique (80°C pendant 72 heures). Le Tableau 11 qui suit présente les mesures de l'activité en FXIII exprimée UI/ml (d'eau purifiée pour injection) et de FXIII-antigène en UI/ml ainsi que le rapport activité en FXIII:FXIII-antigène (noté R) en fonction des variations des concentrations en citrate dans les solutions.

Tableau 11

Solution	Activité FXIII (UI/ml)	FXIII antigène (UI/ml)	R
A1	4,8	6,35	0,76
A2	4,7	6,38	0,74
A3	5,5	6,49	0,85
A4	6,0	5,7	1,05

Les résultats obtenus montrent que plus la concentration en citrate trisodique contenue dans la formulation de l'invention est grande, moins le FXIII subit de dégradations.

Revendications

1. Procédé d'obtention de protéines cryoprécipitables, comprenant une étape d'inactivation virale par traitement thermique d'un lyophilisat desdites protéines, caractérisé en ce qu'il comprend, avant la mise des protéines sous la forme de lyophilisat, une étape initiale d'ajout, auxdites protéines, d'une formulation stabilisante et solubilisante comprenant un mélange d'arginine, d'au moins un acide aminé hydrophobe et de citrate trisodique.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la formulation est constituée dudit mélange d'arginine, d'au moins un acide aminé hydrophobe et de citrate trisodique.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'arginine est présente en une concentration comprise entre 25 et 50 g/l.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la concentration en arginine est comprise entre 35 et 45 g/l.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le citrate trisodique est présent en une concentration comprise entre 0,5 et environ 12 g/l.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'acide aminé hydrophobe est la leucine, l'iso-leucine ou un mélange des deux.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la leucine, l'iso-leucine ou leur mélange est présent en une concentration comprise entre 5 et 15 g/l.

8. Procédé selon l'une des revendications 6 et 7, caractérisé en ce que la concentration en leucine ou iso-leucine ou leur mélange est comprise entre 9 et 11 g/l.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la formulation est en outre additionnée de glycine et/ou de lysine.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce

que la glycine et la lysine sont présentes chacune en une concentration comprise entre 1 et 5 g/l.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que chacune des concentrations en glycine et en lysine est comprise entre 1,5 et 2,5 g/l.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la lyophilisation est effectuée à des températures comprises entre -40°C et -30°C pendant 48 heures.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le traitement thermique d'inactivation virale est effectué à des températures comprises entre 80°C et 90°C pendant 72 heures.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend en outre, préalablement à l'étape d'ajout de la formulation stabilisante et solubilisante à une composition liquide de protéines cryoprécipitables, au moins une étape supplémentaire d'inactivation et/ou d'élimination des virus de ladite composition liquide par solvant-détergent et/ou par nanofiltration sur des filtres de 35 nm.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il est applicable à l'ensemble des protéines cryoprécipitables.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il est applicable à au moins une protéine choisie parmi le Facteur VIII, le Facteur von Willebrand, le Facteur XIII, le fibrinogène et la fibronectine.

17. Concentré d'au moins une protéine cryoprécipitable comprenant la formulation stabilisante et solubilisante introduite selon le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.

18. Concentré selon la revendication 17 destiné à un usage thérapeutique.

19. Concentré lyophilisé de fibrinogène selon la

revendication 17 ou 18, caractérisé en ce qu'après un traitement thermique à des températures de 80°C à 90°C et remise en solution, la solution obtenue présente une filtrabilité d'environ 2 ml/cm^2 sur un filtre à porosité de 0,20 ± 0,02 µm.

20. Formulation stabilisante et solubilisante pour les protéines cryoprécipitables destinées à être soumises à une lyophilisation et à un traitement thermique d'inactivation virale, caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange d'arginine, d'au moins un acide aminé hydrophobe et de citrate trisodique.

21. Formulation stabilisante et solubilisante selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle est constituée dudit mélange d'arginine, d'au moins un acide aminé hydrophobe et de citrate trisodique.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001788

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/36 A61K38/37 A61K47/18 A61K47/12 A61L2/00
C07K14/75

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K C07K A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 650 678 A (BURK WOLFGANG ET AL) 17 March 1987 (1987-03-17) column 2, line 17 - line 30 column 3, line 27 - line 35 example 2	1-21
X	US 2001/049361 A1 (YAMASHITA CHIKAMASA ET AL) 6 December 2001 (2001-12-06) paragraph '0014! - paragraph '0015! paragraphs '0025!, '0032!, '0039!, '0051!, '0053!, '0055! - '0057!, '0060!	1-21
X	WO 99/10011 A (CSL LTD ; GOSS NEIL (AU); KANELLOS JERRY (AU); OATES ADRIAN (AU)) 4 March 1999 (1999-03-04) page 8, line 4 - line 23 page 11, line 1 - line 21	1-21

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 November 2004	03/12/2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Giménez Miralles, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001788

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 197 221 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 17 April 2002 (2002-04-17) paragraph '0012! - paragraph '0017! Voir "samples" 1, 2, 6, 10, 13, 22, 23, 24, 27 et 34tables 1,4,5 paragraph '0077!	1-21
X	US 4 992 419 A (GRUBER WERNER ET AL) 12 February 1991 (1991-02-12) table 2	1-21
X	US 5 919 443 A (MICHAELIS UWE ET AL) 6 July 1999 (1999-07-06) column 4, line 21 - line 62; examples 6,11,12	1-21
Y	US 5 831 027 A (MCINTOSH RONALD VANCE ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) cited in the application column 5, line 38 - line 44 column 6, line 66 - column 7, line 4 example 3	1-21
Y	US 5 399 670 A (BHATTACHARYA PRABIR ET AL) 21 March 1995 (1995-03-21) cited in the application column 2, line 16 - line 26 example 1	1-21
Y	US 4 470 968 A (NG PAUL K ET AL) 11 September 1984 (1984-09-11) column 4, line 19 - line 50 column 6, line 58 - column 7, line 13	1-21
Y	US 4 623 717 A (FERNANDES PETER M ET AL) 18 November 1986 (1986-11-18) example 6	1-21
Y	WINKELMAN L ET AL: "SEVERE HEAT TREATMENT OF LYOPHILISED COAGULATION FACTORS" CURRENT STUDIES IN HEMATOLOGY AND BLOOD TRANSFUSION, KARGER, BASEL, CH, no. 56, 1989, pages 55-69, XP009028964 ISSN: 0258-0330 cited in the application page 57	1-21

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001788

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARGOLIS J ET AL: "STABILISING EFFECT OF AMINOACIDS ON FACTOR VIII IN LYOPHILISED CRYOPRECIPITATE" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, 8 December 1984 (1984-12-08), page 1345, XP009028968 ISSN: 0140-6736 cited in the application the whole document	1-21
A	KYTE J ET AL: "A SIMPLE METHOD FOR DISPLAYING THE HYDROPATHIC CHARACTER OF A PROTEIN" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 157, no. 1, 5 May 1982 (1982-05-05), pages 105-132, XP000609503 ISSN: 0022-2836 cited in the application page 110; table 2	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2004/001788

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4650678 A	17-03-1987	DE 3203775 A1	11-08-1983
		AR 231233 A1	31-10-1984
		AT 22806 T	15-11-1986
		AU 556068 B2	23-10-1986
		AU 1110583 A	11-08-1983
		CA 1186995 A1	14-05-1985
		DE 3366841 D1	20-11-1986
		DK 44483 A ,B,	05-08-1983
		EP 0085923 A1	17-08-1983
		ES 8403321 A1	16-06-1984
		FI 830361 A ,B,	05-08-1983
		GR 77184 A1	11-09-1984
		IE 54547 B1	08-11-1989
		IL 67823 A	31-01-1986
		JP 2025664 C	26-02-1996
		JP 4007328 B	10-02-1992
		JP 58135817 A	12-08-1983
		NO 830371 A ,B	05-08-1983
		NZ 203164 A	30-08-1985
		PT 76193 A ,B	01-03-1983
		ZA 8300726 A	26-10-1983
US 2001049361 A1	06-12-2001	AU 760940 B2	22-05-2003
		AU 4392899 A	17-01-2000
		CA 2301889 A1	06-01-2000
		CN 1272795 T	08-11-2000
		EP 1018345 A1	12-07-2000
		ID 24279 A	13-07-2000
		WO 0000221 A1	06-01-2000
		US 6337067 B1	08-01-2002
WO 9910011 A	04-03-1999	AU 8723198 A	16-03-1999
		WO 9910011 A1	04-03-1999
		CA 2301514 A1	04-03-1999
		EP 1009438 A1	21-06-2000
		NZ 503034 A	23-02-2001
		PL 338856 A1	20-11-2000
		ZA 9807633 A	25-02-1999
EP 1197221 A	17-04-2002	JP 2000247903 A	12-09-2000
		AU 772604 B2	06-05-2004
		AU 2695400 A	21-09-2000
		CA 2381229 A1	08-09-2000
		EP 1197221 A1	17-04-2002
		CN 1342087 T	27-03-2002
		WO 0051629 A1	08-09-2000
US 4992419 A	12-02-1991	DE 3729863 A1	16-03-1989
		AT 77556 T	15-07-1992
		AU 2173988 A	27-04-1989
		CA 1330301 C	21-06-1994
		CN 1031801 A ,B	22-03-1989
		CS 8805901 A2	13-12-1990
		DD 273004 A5	01-11-1989
		DE 3872334 D1	30-07-1992
		DK 483188 A	06-03-1989
		EP 0306824 A2	15-03-1989
		ES 2051806 T3	01-07-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2004/001788

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4992419 A		FI 884051 A ,B,	06-03-1989
		GR 3005454 T3	24-05-1993
		HK 89495 A	16-06-1995
		HU 47863 A2	28-04-1989
		IE 60310 B1	29-06-1994
		IL 87628 A	08-07-1993
		JP 1071818 A	16-03-1989
		JP 2057196 C	23-05-1996
		JP 7080782 B	30-08-1995
		KR 9609929 B1	25-07-1996
		LV 10178 A ,B	20-10-1994
		LV 10393 A ,B	20-02-1995
		MX 12880 A	01-12-1993
		NO 883926 A ,B,	06-03-1989
		NZ 225975 A	26-07-1991
		PH 25618 A	08-08-1991
		PL 274485 A1	17-04-1989
		PT 88417 A ,B	31-07-1989
		RU 2043118 C1	10-09-1995
		RU 2100032 C1	27-12-1997
		ZA 8806528 A	30-05-1989
US 5919443 A	06-07-1999	DE 4242863 A1	23-06-1994
		AT 165007 T	15-05-1998
		AU 676573 B2	13-03-1997
		AU 6808694 A	19-07-1994
		CA 2151732 A1	07-07-1994
		DE 59308415 D1	20-05-1998
		DK 674524 T3	01-02-1999
		WO 9414465 A1	07-07-1994
		EP 0674524 A1	04-10-1995
		ES 2117781 T3	16-08-1998
		HU 74269 A2	28-11-1996
		JP 8504784 T	21-05-1996
		KR 266145 B1	15-09-2000
		NZ 258912 A	24-06-1997
		SG 66740 A1	21-09-1999
US 5831027 A	03-11-1998	AT 233576 T	15-03-2003
		AU 692018 B2	28-05-1998
		AU 4183296 A	26-06-1996
		CA 2206670 A1	13-06-1996
		DE 69529845 D1	10-04-2003
		DE 69529845 T2	11-12-2003
		DK 804254 T3	30-06-2003
		EP 0804254 A1	05-11-1997
		ES 2193206 T3	01-11-2003
		WO 9617631 A1	13-06-1996
		JP 10510257 T	06-10-1998
US 5399670 A	21-03-1995	AU 670793 B2	01-08-1996
		AU 4223893 A	29-11-1993
		EP 0638091 A1	15-02-1995
		WO 9322336 A1	11-11-1993
US 4470968 A	11-09-1984	DE 3400413 A1	19-07-1984
US 4623717 A	18-11-1986	AT 30296 T	15-11-1987

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2004/001788

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4623717 A		CA 1187410 A1	21-05-1985
		DE 3176491 D1	26-11-1987
		DK 98681 A ,B,	06-09-1981
		EP 0035204 A2	09-09-1981
		ES 8201827 A1	01-04-1982
		JP 1980554 C	17-10-1995
		JP 6011702 B	16-02-1994
		JP 56139422 A	30-10-1981
		MX 6967 E	09-01-1987
		US 4440679 A	03-04-1984

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/001788

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K38/36 A61K38/37 A61K47/18 A61K47/12 A61L2/00
C07K14/75

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61K C07K A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 4 650 678 A (BURK WOLFGANG ET AL) 17 mars 1987 (1987-03-17) colonne 2, ligne 17 - ligne 30 colonne 3, ligne 27 - ligne 35 exemple 2	1-21
X	US 2001/049361 A1 (YAMASHITA CHIKAMASA ET AL) 6 décembre 2001 (2001-12-06) alinéa '0014! - alinéa '0015! alinéas '0025!, '0032!, '0039!, '0051!, '0053!, '0055! - '0057!, '0060!	1-21
X	WO 99/10011 A (CSL LTD ; GOSS NEIL (AU); KANELLOS JERRY (AU); OATES ADRIAN (AU)) 4 mars 1999 (1999-03-04) page 8, ligne 4 - ligne 23 page 11, ligne 1 - ligne 21	1-21

-/--

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
24 novembre 2004	03/12/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Giménez Miralles, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/001788

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 1 197 221 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 17 avril 2002 (2002-04-17) alinéa '0012! - alinéa '0017! Voir "samples" 1, 2, 6, 10, 13, 22, 23, 24, 27 et 34tableaux 1,4,5 alinéa '0077!	1-21
X	US 4 992 419 A (GRUBER WERNER ET AL) 12 février 1991 (1991-02-12) tableau 2	1-21
X	US 5 919 443 A (MICHAELIS UWE ET AL) 6 juillet 1999 (1999-07-06) colonne 4, ligne 21 - ligne 62; exemples 6,11,12	1-21
Y	US 5 831 027 A (MCINTOSH RONALD VANCE ET AL) 3 novembre 1998 (1998-11-03) cité dans la demande colonne 5, ligne 38 - ligne 44 colonne 6, ligne 66 - colonne 7, ligne 4 exemple 3	1-21
Y	US 5 399 670 A (BHATTACHARYA PRABIR ET AL) 21 mars 1995 (1995-03-21) cité dans la demande colonne 2, ligne 16 - ligne 26 exemple 1	1-21
Y	US 4 470 968 A (NG PAUL K ET AL) 11 septembre 1984 (1984-09-11) colonne 4, ligne 19 - ligne 50 colonne 6, ligne 58 - colonne 7, ligne 13	1-21
Y	US 4 623 717 A (FERNANDES PETER M ET AL) 18 novembre 1986 (1986-11-18) exemple 6	1-21
Y	WINKELMAN L ET AL: "SEVERE HEAT TREATMENT OF LYOPHILISED COAGULATION FACTORS" CURRENT STUDIES IN HEMATOLOGY AND BLOOD TRANSFUSION, KARGER, BASEL, CH, no. 56, 1989, pages 55-69, XP009028964 ISSN: 0258-0330 cité dans la demande page 57	1-21

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/001788

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MARGOLIS J ET AL: "STABILISING EFFECT OF AMINOACIDS ON FACTOR VIII IN LYOPHILISED CRYOPRECIPITATE" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, 8 décembre 1984 (1984-12-08), page 1345, XP009028968 ISSN: 0140-6736 cité dans la demande le document en entier	1-21
A	KYTE J ET AL: "A SIMPLE METHOD FOR DISPLAYING THE HYDROPATHIC CHARACTER OF A PROTEIN" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 157, no. 1, 5 mai 1982 (1982-05-05), pages 105-132, XP000609503 ISSN: 0022-2836 cité dans la demande page 110; tableau 2	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements rel[illegible] ix membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR2004/001788

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4650678 A	17-03-1987	DE 3203775 A1	11-08-1983
		AR 231233 A1	31-10-1984
		AT 22806 T	15-11-1986
		AU 556068 B2	23-10-1986
		AU 1110583 A	11-08-1983
		CA 1186995 A1	14-05-1985
		DE 3366841 D1	20-11-1986
		DK 44483 A ,B,	05-08-1983
		EP 0085923 A1	17-08-1983
		ES 8403321 A1	16-06-1984
		FI 830361 A ,B,	05-08-1983
		GR 77184 A1	11-09-1984
		IE 54547 B1	08-11-1989
		IL 67823 A	31-01-1986
		JP 2025664 C	26-02-1996
		JP 4007328 B	10-02-1992
		JP 58135817 A	12-08-1983
		NO 830371 A ,B	05-08-1983
		NZ 203164 A	30-08-1985
		PT 76193 A ,B	01-03-1983
		ZA 8300726 A	26-10-1983
US 2001049361 A1	06-12-2001	AU 760940 B2	22-05-2003
		AU 4392899 A	17-01-2000
		CA 2301889 A1	06-01-2000
		CN 1272795 T	08-11-2000
		EP 1018345 A1	12-07-2000
		ID 24279 A	13-07-2000
		WO 0000221 A1	06-01-2000
		US 6337067 B1	08-01-2002
WO 9910011 A	04-03-1999	AU 8723198 A	16-03-1999
		WO 9910011 A1	04-03-1999
		CA 2301514 A1	04-03-1999
		EP 1009438 A1	21-06-2000
		NZ 503034 A	23-02-2001
		PL 338856 A1	20-11-2000
		ZA 9807633 A	25-02-1999
EP 1197221 A	17-04-2002	JP 2000247903 A	12-09-2000
		AU 772604 B2	06-05-2004
		AU 2695400 A	21-09-2000
		CA 2381229 A1	08-09-2000
		EP 1197221 A1	17-04-2002
		CN 1342087 T	27-03-2002
		WO 0051629 A1	08-09-2000
US 4992419 A	12-02-1991	DE 3729863 A1	16-03-1989
		AT 77556 T	15-07-1992
		AU 2173988 A	27-04-1989
		CA 1330301 C	21-06-1994
		CN 1031801 A ,B	22-03-1989
		CS 8805901 A2	13-12-1990
		DD 273004 A5	01-11-1989
		DE 3872334 D1	30-07-1992
		DK 483188 A	06-03-1989
		EP 0306824 A2	15-03-1989
		ES 2051806 T3	01-07-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements rel ix membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR2004/001788

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 4992419	A		FI	884051 A ,B,	06-03-1989
			GR	3005454 T3	24-05-1993
			HK	89495 A	16-06-1995
			HU	47863 A2	28-04-1989
			IE	60310 B1	29-06-1994
			IL	87628 A	08-07-1993
			JP	1071818 A	16-03-1989
			JP	2057196 C	23-05-1996
			JP	7080782 B	30-08-1995
			KR	9609929 B1	25-07-1996
			LV	10178 A ,B	20-10-1994
			LV	10393 A ,B	20-02-1995
			MX	12880 A	01-12-1993
			NO	883926 A ,B,	06-03-1989
			NZ	225975 A	26-07-1991
			PH	25618 A	08-08-1991
			PL	274485 A1	17-04-1989
			PT	88417 A ,B	31-07-1989
			RU	2043118 C1	10-09-1995
			RU	2100032 C1	27-12-1997
			ZA	8806528 A	30-05-1989
US 5919443	A	06-07-1999	DE	4242863 A1	23-06-1994
			AT	165007 T	15-05-1998
			AU	676573 B2	13-03-1997
			AU	6808694 A	19-07-1994
			CA	2151732 A1	07-07-1994
			DE	59308415 D1	20-05-1998
			DK	674524 T3	01-02-1999
			WO	9414465 A1	07-07-1994
			EP	0674524 A1	04-10-1995
			ES	2117781 T3	16-08-1998
			HU	74269 A2	28-11-1996
			JP	8504784 T	21-05-1996
			KR	266145 B1	15-09-2000
			NZ	258912 A	24-06-1997
			SG	66740 A1	21-09-1999
US 5831027	A	03-11-1998	AT	233576 T	15-03-2003
			AU	692018 B2	28-05-1998
			AU	4183296 A	26-06-1996
			CA	2206670 A1	13-06-1996
			DE	69529845 D1	10-04-2003
			DE	69529845 T2	11-12-2003
			DK	804254 T3	30-06-2003
			EP	0804254 A1	05-11-1997
			ES	2193206 T3	01-11-2003
			WO	9617631 A1	13-06-1996
			JP	10510257 T	06-10-1998
US 5399670	A	21-03-1995	AU	670793 B2	01-08-1996
			AU	4223893 A	29-11-1993
			EP	0638091 A1	15-02-1995
			WO	9322336 A1	11-11-1993
US 4470968	A	11-09-1984	DE	3400413 A1	19-07-1984
US 4623717	A	18-11-1986	AT	30296 T	15-11-1987

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements re ux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR2004/001788

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4623717 A		CA 1187410 A1	21-05-1985
		DE 3176491 D1	26-11-1987
		DK 98681 A ,B,	06-09-1981
		EP 0035204 A2	09-09-1981
		ES 8201827 A1	01-04-1982
		JP 1980554 C	17-10-1995
		JP 6011702 B	16-02-1994
		JP 56139422 A	30-10-1981
		MX 6967 E	09-01-1987
		US 4440679 A	03-04-1984