

(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
11 avril 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/28362 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **A61K 9/00**

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03097

(22) Date de dépôt international : 8 octobre 2001 (08.10.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/12805 6 octobre 2000 (06.10.2000) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **AVEN-
TIS PASTEUR** [FR/FR]; 2, avenue pont Pasteur, F-69007
Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **FRAN-
CON, Alain** [FR/FR]; La Grande Croix, Brullioles,
F-69690 Bessenay (FR). **NOEL, Catherine** [FR/FR]; 17,
montée des Roches, F-69130 Ecully (FR).

(74) Mandataires : **KERNEIS, Danièle** etc.; Aventis Pasteur,
Direction de la Propriété Intellectuelle, 2, avenue pont Pas-
teur, F-69007 Lyon (FR).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet 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 abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: VACCINE COMPOSITION AND STABILISATION METHOD

(54) Titre : COMPOSITION VACCINALE ET PROCEDE DE STABILISATION

(57) Abstract: The invention concerns the stabilisation of a vaccine composition maintained in liquid state by the use of high molecular weight polyvinylpyrrolidone, hence eliminating the use of albumen. The invention is of particular interest for vaccine compositions comprising attenuated live viruses such as oral vaccine against poliomyelitis.

(57) Abrégé : L'invention est relative à la stabilisation de composition vaccinale maintenue à l'état liquide grâce à l'utilisation de polyvinylpyrrolidone de haut poids moléculaire, ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation d'albumine. Cette invention est d'un intérêt particulier pour les compositions vaccinales comprenant des virus vivants atténués, tels que le vaccin oral contre la poliomyélite.

WO 02/28362 A2

COMPOSITION VACCINALE ET PROCEDE DE STABILISATION

La présente invention est relative au domaine des vaccins. Plus particulièrement,
5 l'invention est relative à la stabilisation de vaccins liquides.

Un des problèmes majeurs dans le domaine des vaccins est leur stabilité, c'est-à-dire la conservation de leur efficacité au cours du temps. Une des solutions proposées pour résoudre le problème de la stabilité est la lyophilisation. Cette solution, satisfaisante d'un
10 point technique, présente cependant des inconvénients : d'une part, elle représente pour l'industriel une étape supplémentaire, ce qui accroît les coûts et les durées de fabrication, et d'autre part, elle implique, pour l'utilisateur, une opération préalable à l'administration du produit : l'opération de reprise du lyophilisat.

Une autre solution proposée dans l'art antérieur pour conserver l'efficacité dans le temps
15 des vaccins est d'utiliser des formulations stabilisantes qui comprennent généralement de l'albumine. Cependant, les risques de contamination présentés par l'utilisation d'albumine d'origine humaine ou animale, ainsi que les coûts très importants liés à l'utilisation d'albumine recombinante, ont conduit à la recherche de substituts de l'albumine pour stabiliser des vaccins liquides.

La substitution de l'albumine a déjà été recherchée pour d'autres applications
20 pharmaceutiques. Ainsi, le brevet US 3915794 propose-t-il de remplacer les protéines animales telles que l'albumine ou la caséine par du Polyvinylpyrrolidone (PVP) de bas poids moléculaire lors de la phase d'extraction des virus des cellules ainsi que lors de l'étape de lyophilisation qui a lieu ultérieurement.

Cependant, un produit capable de remplacer l'albumine dans certaines de ses fonctions,
25 n'est pas toujours efficace pour d'autres applications et ne peut donc pas être considéré comme un remplaçant universel de l'albumine.

Des essais de stabilisation dans le temps de vaccins liquides ont ainsi été menés avec le PVP de bas poids moléculaire qui est décrit dans le brevet US précité; cependant, ces
30 essais n'ont pas conduit à des résultats satisfaisants.

Il existe donc un besoin de trouver des formulations, dépourvues d'albumine et capables de stabiliser des compositions vaccinales liquides, notamment des compositions comprenant des virus, et en particulier des virus vivants atténués.

Pour atteindre ce but, l'invention propose un procédé de stabilisation d'une composition vaccinale à l'état liquide selon lequel on ajoute à la composition vaccinale du polyvinylpyrrolidone de haut poids moléculaire.

5

L'invention a également pour objet une composition vaccinale liquide stable au cours du temps, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène viral, et au moins du polyvinylpyrrolidone de haut poids moléculaire

10

Selon une caractéristique particulière de l'invention, le poids moléculaire du PVP est supérieur ou égal à 100 000 daltons.

Selon une autre caractéristique de l'invention, le PVP est utilisé à une concentration d'au moins 0,1% en poids, et de préférence inférieure ou égale à 5%.

15

Selon une autre caractéristique de l'invention, la composition vaccinale comprend des virus vivants atténués. Il peut notamment s'agir d'une composition vaccinale contre la poliomyélite, destinée à une administration par voie orale.

20

Selon une autre caractéristique de l'invention, la composition vaccinale comprend en outre des sels ou des sucres ainsi qu'au moins un tensio-actif. Dans ces conditions, les résultats de stabilité obtenus sont particulièrement satisfaisants.

25

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront au cours de la description détaillée qui suit.

30

Les compositions vaccinales dont il convient d'assurer la stabilité dans le temps sont des compositions vaccinales comprenant au moins un antigène constitué par un virus. La stabilité de telles compositions est appréciée, selon des critères définis par les différentes autorités réglementaires, par le maintien, au cours du temps, du titre infectieux de la composition vaccinale, ce qui signifie que les virus utilisés comme antigènes doivent conserver leur capacité à infecter des cellules.

Parmi les compositions vaccinales susceptibles d'être utilisées selon le procédé de l'invention, on peut citer les vaccins comprenant des virus vivants atténués et, en particulier, les vaccins contre la poliomyélite. Il peut s'agir de compositions vaccinales monovalentes, c'est-à-dire destinées à la protection contre une seule maladie (même si elles peuvent comprendre plusieurs types d'une même valence, tel que cela est le cas avec la poliomyélite ou la Dengue par exemple) ou de compositions multivalentes c'est-à-dire de vaccins destinés à la protection contre plusieurs maladies, l'une au moins des valences étant constituée par un virus vivant atténué tel que décrit ci-dessus.

Le procédé selon l'invention a montré tout son intérêt pour la stabilisation du vaccin oral contre la poliomyélite, qui est un vaccin à virus vivant atténué comprenant les 3 types de virus de la poliomyélite.

Selon l'invention, la composition vaccinale est stabilisée grâce à un ajout de Polyvinylpyrrolidone (ou PVP) à haut Poids Moléculaire, notamment du PVP360 dont le PM est de 360 000 Daltons. En effet, contre toute attente, alors que le PVP de bas poids moléculaire décrit dans l'art antérieur comme facteur de stabilisation pendant la phase d'extraction des virus aussi bien que pendant la phase de lyophilisation puis la phase de stockage du lyophilisat ne permettait pas de stabiliser de façon satisfaisante une composition vaccinale à l'état liquide, il a été trouvé que le PVP de haut poids moléculaire permettait de remplacer très avantageusement l'albumine utilisée habituellement dans les formulations stabilisantes des compositions vaccinales liquides. La bonne qualité des résultats obtenus est d'autant plus surprenante qu'elle est en contradiction avec l'enseignement du brevet US 3915794, selon lequel le PVP K90 qui a un PM de 360 000 n'est pas satisfaisante pour la stabilisation de suspension virale.

Le PVP est un produit chimique de synthèse ; son origine n'est pas critique au regard de la présente invention, pourvu qu'il soit de qualité pharmaceutiquement acceptable. Ainsi le PVP360, fournie par SIGMA convient parfaitement à l'utilisation selon la présente invention.

La concentration en PVP est au moins égale à 0,1% en poids/volume. Afin de ne pas avoir de problème lié à la viscosité du milieu, il est cependant souhaitable de ne pas excéder une concentration de 5%. De bons résultats ont été obtenus avec une concentration de 1%.

Avantageusement, la composition vaccinale selon l'invention comprend également une certaine quantité de tensio-actif, tel que du Polyéthylèneglycol (ou PEG). On peut également utiliser du TweenTM 80 ou Polysorbate 80. La quantité de tensio-actif utilisée est de préférence une quantité inférieure à 0,007% en poids/volume. Une quantité de TweenTM 80 de 0,004% a conduit à de particulièrement bons résultats.

Selon une caractéristique de l'invention, la composition vaccinale comprend en outre des sels tels que le chlorure de magnésium MgCl₂, en concentration sensiblement molaire; la composition vaccinale peut également comprendre des sucres tels que le glucose et le saccharose dont les concentrations peuvent varier d'environ 20% à environ 40%; cependant, la présence de ces sucres n'est pas critique pour l'effet de stabilisant.

La composition vaccinale peut également comprendre tout autre élément habituellement utilisé dans les vaccins, tels que des conservateurs et/ou des adjuvants. Elle peut notamment comprendre des substances tampon, tel que le tampon Hépès en concentration égale à environ 20mM.

Les exemples qui suivent illustrent des modes de réalisation particuliers de la présente invention.

Exemple 1

On produit des suspensions virales des 3 différents types de poliomyélite de la manière suivante:

Un biogénérateur contenant des cellules Vero au 142^{ème} passage, en milieu Parker 199, est inoculé par l'un des types de virus polio. La culture virale s'effectue à une température d'environ 34°C. Après une durée ne dépassant pas 96 heures, la lyse cellulaire étant totale, on procède à la récolte virale qui s'effectue par récupération du surnageant. La récolte est filtrée sur membrane ayant un seuil de coupure à 100 000, puis purifiée par passage sur colonne DEAE Spherox équilibrée au préalable à pH 7 en tampon phosphate 40mM.

Dans ces conditions, les impuretés sont retenues par la colonne alors que les virus la traversent librement.

La suspension virale ayant traversé la colonne est alors filtrée sur membrane ayant un seuil de coupure à 10 000, puis soumise à une ultracentrifugation zonale sur gradient de

On obtient ainsi une suspension monovalente d'un type donné (I, II ou III) de virus polio.

Exemple 2

On prépare, à partir des compositions monovalentes préparées à l'exemple 1, des compositions vaccinales en mélangeant:

- de la suspension virale de type I,
- de la suspension virale de type II,
- de la suspension virale de type III,

en quantités permettant d'atteindre sous un volume de 100 ml un titre pour chacune des souches de $6.3 \log_{10} \text{DICC50/dose}$,

auquel on ajoute un des mélanges suivants, afin d'obtenir les compositions dont on veut tester la stabilité:

- de l'albumine à 1%, du MgCl_2 1M, du tampon Hépès 20mM, et du Tween™ 80 à 0,002%,
- du PVP360, du MgCl_2 1M, du tampon Hépès 20mM,
- du PVP360 à différentes concentrations, du MgCl_2 1M, du tampon Hépès 20mM, et du Tween™ 80 à différentes concentrations,
- du PVP360 à différentes concentrations, du tampon Hépès 20mM, du Tween™ 80 à 0,002% et des sucres (glucose et saccharose) à différentes concentrations,
- du PVP10 à différentes concentrations, du MgCl_2 1M, du tampon Hépès 20mM, et du Tween™ 80 à 0,002%, ou bien
- du PVP40 à différentes concentrations, du MgCl_2 1M, du tampon Hépès 20mM, et du Tween™ 80 à 0,002%.

Les différentes compositions sont maintenues 5 jours à 37 °C, i.e. dans des conditions qui sont des conditions de vieillissement accéléré permettant d'évaluer la stabilité des compositions obtenues.

5 Exemple 3

On évalue la stabilité des compositions virales préparées grâce à l'appréciation de la diminution du titre infectieux au cours du temps. La détermination du titre infectieux est effectuée par la technique de la DICC50 qui est effectuée de la manière suivante:

10 Le titrage est réalisé sur microplaques 96 puits.

On dilue les échantillons de -1 à -6 ou -7 (en log10) dans du milieu MEM 1xC avec 2% (volume/volume) de sérum de veau fœtal ne contenant pas d'anticorps contre la polio, 4% (volume/volume) de bicarbonate de sodium à 5,6% (volume/volume) sans rouge de phénol et 0,2% d'une solution d'antibiotique pénicilline-didromycine 400xC (volume/volume).

15 Pour chaque dilution, on répartit 50µl dans 4 rangées de 10 cupules:

- dans la 1^{ère} rangée, on ajoute 50µl de milieu de dilution (titre global)
- dans la 2^{nde} rangée, on ajoute 50µl d'antisérum anti-polio type2 plus antisérum anti-polio type 3 dilués dans du milieu MEM, pour neutraliser les virus polio type 2 et 3 contenus dans la composition vaccinale (titrage du type I),
- 20 - dans la 3^{ème} rangée, on ajoute 50µl d'antisérum anti-polio type1 plus antisérum anti-polio type 3 dilués dans du milieu MEM, pour neutraliser les virus polio type 1 et 3 contenus dans la composition vaccinale (titrage du type II),
- dans la 4^{ème} rangée, on ajoute 50µl d'antisérum anti-polio type1 plus antisérum anti-polio type 2 dilués dans du milieu MEM, pour neutraliser les virus polio type 1 et 2
- 25 contenus dans la composition vaccinale (titrage du type III),

Les 8 cupules de la dernière colonne de chacune des plaques servent de témoins cellules: on y met 100µl de milieu MEM par cupule.

On recouvre les plaques au moyen d'un couvercle; on agite latéralement et on laisse en contact 1 heure à 37 °C.

30 Après ce temps de contact, on ajoute à chaque cupule 100µl de suspension cellulaire HepII à 50000 cellules/ml. On place les plaques 9 jours à l'étuve à 36°C.

Pour préparer la suspension cellulaire, on doit procéder de la façon suivante: dissocier les cellules par action de la trypsine, numérer et diluer la suspension cellulaire pour obtenir une concentration de 50000 cellules/ml.

On lit les effets pathogènes dans chacune des cupules après avoir vérifié l'intégrité des témoins cellules.

Le calcul du titre est effectué en utilisant une régression linéaire sur les différentes dilutions après transformation des données en arc sinus de la racine des proportions de cupules positives.

Les dosages sont réalisés, pour chacune des compositions virales préparées, à T0 et après 5 jours à 37°C.

Les résultats obtenus, exprimés en différence entre le titre à T0 et le titre après vieillissement accéléré 5 jours à 37°C, sont récapitulés dans le tableau ci-après; ils sont considérés satisfaisants lorsqu'ils sont sensiblement équivalents ou inférieurs à ceux obtenus avec une composition vaccinale de l'art antérieur, i.e. stabilisée par de l'albumine à 1%,

	Type 1	Type 2	Type 3	Global
Albumine 1% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	0,82	0,67	0,67	0,67
PVP360 1 % + MgCl ₂ + Hepes	0,06	0,22	0,07	0,17
PVP360 1% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	0,85	0,75	0,85	0,85
PVP360 2% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	1,00	0,85	0,60	0,75
PVP360 5% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	1,13	0,67	1,22	1,43
PVP360 10% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	1,80	1,50	1,65	1,65
PVP360 0,1% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,004%	1,20	1,45	0,90	1,20
PVP360 0,5% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,004%	0,60	0,70	0,55	0,75
PVP360 1% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,004%	0,72	0,59	0,87	0,68
PVP360 1,5% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,004%	0,90	0,55	0,85	0,85
PVP360 2,5% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,004%	0,82	1,05	0,95	0,53
PVP360 4,9% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,004%	1,00	0,85	1,25	0,75

	Type 1	Type 2	Type 3	Global
PVP360 1% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,006%	0,85	0,55	0,85	0,65
PVP360 2% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,006%	0,50	0,70	1,00	0,45
PVP360 1,3% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,007%	0,85	0,80	1,00	0,80
PVP360 3,7% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,007%	1,05	0,70	1,25	0,80
PVP360 2,5% + Hepes + Tween 0,002% + Glucose 20% + Saccharose 40%	1,45	1,20	0,95	1,20
PVP360 1,25% + Hepes + Tween 0,002% + Glucose 30% + Saccharose 40%	1,35	1,10	0,80	1,05
PVP360 1,25 % + Hepes + Tween 0,002% + Glucose 20% + Saccharose 28%	1,00	0,85	0,40	0,95
PVP10 5% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	2,15	2,10	2,00	2,30
PVP10 10% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	2,10	2,45	2,10	2,15
PVP10 30% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	2,65	2,85	2,55	3,10
PVP40 5% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	Titre inférieur à 3,50 après vieillissement accéléré			3,55
PVP40 10% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%	Titre inférieur à 3,50 après test de vieillissement accéléré			
PVP40 30% + MgCl ₂ + Hepes + Tween 0,002%				

REVENDICATIONS

1. Procédé de stabilisation d'une composition vaccinale à l'état liquide, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter à la composition vaccinale du polyvinylpyrrolidone de haut poids
5 moléculaire.

2. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le poids moléculaire est supérieur ou égal à 100 000.

10 3. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration en polyvinylpyrrolidone est d'au moins 0,1%.

4. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la concentration en polyvinylpyrrolidone est inférieure ou égale à 5%.

15 5. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste en outre à ajouter à la composition vaccinale du chlorure de magnésium en concentration sensiblement molaire.

20 6. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste en outre à ajouter à la composition vaccinale au moins un tensio-actif à une concentration inférieure ou égale à 0,007%.

25 7. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter à la composition vaccinale du Polysorbate 80 en concentration égale à 0,004%.

8. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la composition vaccinale comprend au moins un antigène constitué par un virus vivant atténué.

30 9. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la composition vaccinale comprend les 3 sérotypes du virus de la poliomyélite.

35 10. Composition vaccinale liquide stable au cours du temps, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène viral, et au moins du polyvinylpyrrolidone de haut poids moléculaire.