

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION BELGE

(41) Date de publication : 23/11/2017

(21) Numéro de demande : BE2016/5950

(22) Date de dépôt : 20/12/2016

(62) Divisée de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A61K 39/12, A61K 39/00

(30) Données de priorité :

22/12/2015 US 62270693

(71) Demandeur(s) :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
1330, RIXENSART
Belgique

(72) Inventeur(s) :

DEBLOCK Thierry
1330 RIXENSART
Belgique

MATHOT Frédéric
1330 RIXENSART
Belgique

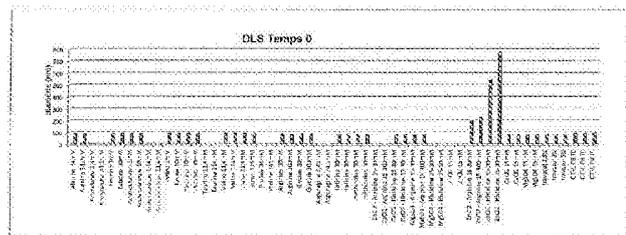
CLAES Brigitte
1330 RIXENSART
Belgique

MORALES AIRA Maria
1330 RIXENSART
Belgique

(54) FORMULATION IMMUNOGÈNE

(57) La présente invention concerne des formulations de compositions immunogènes comprenant une ou plusieurs souches de virus de la dengue inactivé et purifié.

Figure 1



FORMULATION IMMUNOGÈNE

La présente divulgation concerne des formulations de compositions immunogènes. En particulier, la présente divulgation concerne des formulations de compositions immunogènes contenant une ou plusieurs souches de virus de la dengue purifiés et inactivés.

Les virus de la dengue (DEN ou DENV) sont des membres de la famille des flaviviridae. Comme le prototype de la famille, le virus de la fièvre jaune (YF), les virus de la dengue sont des virus enveloppés à ARN simple brin ayant une taille d'environ 50 nm (description détaillée dans Henchal and Putnak, Clin. Microbiol. Rev. 3 : 376-96 (1990)). Dans le groupe de la dengue, on trouve quatre sérotypes, la dengue de type un (dengue-1 ou DEN1), la dengue de type 2 (dengue-2 ou DEN2), la dengue de type 3 (dengue-3 ou DEN3) et la dengue de type 4 (dengue-4 ou DEN4). Bien qu'il existe une similarité génétique et antigénique considérable entre les sérotypes, il n'existe aucune neutralisation croisée significative (Calisher *et al.* J. Gen. Virol. 70 : 37-43 (1989)).

Le virus de la dengue peut être transmis aux humains par les moustiques, en provoquant une maladie virale aiguë. La maladie virale de la dengue est endémique des régions tropicales et subtropicales du monde. Une infection avec l'un quelconque des quatre sérotypes de DENV peut provoquer une infection asymptomatique, une maladie virale légère non spécifique, la fièvre classique de la dengue ou une maladie grave de la dengue avec tendance hémorragique. Bien qu'ils soient

relativement rares, la fièvre hémorragique due à la dengue (DHF) et le syndrome de choc dû à la dengue (DSS) sont des causes importantes de décès chez les enfants.

Après une infection avec un sérotype du virus de la dengue, les humains qui sont une nouvelle fois infectés par un sérotype différent du virus de la dengue présentent un risque accru de développer une maladie grave. Les mécanismes responsables du renforcement ultérieur de la maladie ne sont pas bien compris (voir, par exemple, Halstead, Rev. Infect. Dis. 11 : Suppl 4 : S830-S839 (1989) ; Rothman, Nat. Rev. Immunol. 11 : 532-543 (2011), Guzman and Isturiz, Int. J. Antimicrob. Agents 36 : S40-S42 (2010)).

La prévention et la lutte contre une maladie humaine provoquée par le virus de la dengue sont principalement réalisées, à l'heure actuelle, par le contrôle du vecteur qu'est le moustique. Par conséquent, il reste un besoin pour des vaccins sûrs et efficaces contre tous les sérotypes du virus de la dengue, et des procédés pour les produire.

Le développement d'un vaccin efficace contre la dengue a été entravé à cause de problèmes de stabilité des préparations virales après la purification du virus. En particulier, le sérotype DEN4 présente une stabilité réduite à température ambiante (par rapport aux autres sérotypes), ce qui accroît la difficulté de préparation du PIV DEN4 sous la forme d'un composant vaccinal en vrac. Il existe un besoin pour des formulations immunogènes comprenant DEN4 qui sont stables pendant leur stockage.

Un aspect de la présente invention est une composition immunogène comprenant un virus de la dengue de sérotype 4 inactivé et purifié, un agent tampon, un tensioactif et un excipient améliorant la stabilité.

5 Dans un aspect supplémentaire de la présente invention, l'excipient améliorant la stabilité est choisi parmi un sel inorganique et un sucre, comme CaCl_2 , MgSO_4 et le saccharose.

Dans un aspect supplémentaire de la présente invention, l'excipient améliorant la stabilité est
10 choisi parmi MgSO_4 à une concentration d'au moins ou d'environ 1,8 mM, d'au moins ou d'environ 3,75 mM, d'au moins ou d'environ 7,5 mM, d'au moins ou d'environ 15 mM, d'au moins ou d'environ 30 mM, et d'au moins ou d'environ
15 45 mM.

Dans un aspect supplémentaire de l'invention, l'excipient améliorant la stabilité est choisi parmi CaCl_2 à une concentration d'au moins ou d'environ 1,8 mM, d'au moins ou d'environ 3,75 mM, d'au moins ou d'environ
20 7,5 mM, d'au moins ou d'environ 15 mM, d'au moins ou d'environ 30 mM, et d'au moins ou d'environ 45 mM.

Dans un aspect supplémentaire de l'invention, l'excipient améliorant la stabilité est le saccharose à une concentration d'au moins ou d'environ 8 % en
25 poids/volume (p/v), ou d'au moins ou d'environ 10 % en p/v.

Dans un aspect supplémentaire, la composition immunogène de l'invention comprend du saccharose et au moins un excipient supplémentaire choisi parmi CaCl_2 et
30 MgSO_4 .

Dans un aspect supplémentaire de l'invention, la composition comprend en outre un adjuvant. L'adjuvant peut être un adjuvant sans aluminium, ou un sel d'aluminium, tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium.

Dans un aspect supplémentaire de l'invention, la composition comprend en outre au moins un sérotype supplémentaire de virus de la dengue inactivé et purifié.

Dans un aspect supplémentaire de l'invention, la composition comprend un virus de la dengue de sérotype 1 inactivé et purifié (PIV DEN1), un virus de la dengue de sérotype 2 inactivé et purifié (PIV DEN2) et un virus de la dengue de sérotype 3 inactivé et purifié (PIV DEN3).

Un aspect supplémentaire de l'invention est un procédé de formulation d'une préparation en vrac de virus de la dengue inactivé et purifié ou d'une formulation vaccinale finie de celle-ci, comprenant la fourniture d'une solution comprenant de l'eau stérile, un agent tampon, un tensioactif et un excipient améliorant la stabilité ; et l'ajout à la solution d'un virus de la dengue inactivé et purifié.

La figure 1 est un graphique représentant les résultats DLS pour une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 1, au temps 0. L'axe des Y est la taille moyenne Z des particules virales en nanomètre (nm). Le témoin (CTRL PB) est la formulation de base contenant la substance médicamenteuse PIV DEN4 (sans aucun excipient testé).

La figure 2 est un graphique représentant les résultats DLS pour une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 1,

après stockage pendant 48 heures à 25 °C (T48h25 °C). Les unités de l'axe des Y et le témoin (CTRL PB) sont comme sur la figure 1.

La figure 3 est un graphique représentant la
5 récupération HP-SEC-UV pour une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 1, après 48 heures de stockage à 25 °C. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à la courbe étalon. Les témoins sont la formulation de base contenant
10 la substance médicamenteuse PIV DEN4 (sans aucun excipient testé).

La figure 4 est un graphique représentant les résultats DLS pour une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 2,
15 au temps 0. L'axe des Y est la taille moyenne Z des particules virales en nanomètre (nm). Le témoin (CTRL PB) est la formulation de base contenant la substance médicamenteuse PIV DEN4 (sans aucun excipient testé).

La figure 5 est un graphique représentant les
20 résultats DLS pour une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 2, après stockage pendant 48 heures à 25 °C (T48h25 °C). Les unités de l'axe des Y et le témoin (CTRL PB) sont comme sur la figure 4.

25 La figure 6 est un graphique représentant la récupération HP-SEC-UV pour une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 2, après 48 heures de stockage à 25 °C. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à la courbe
30 étalon. Les témoins sont le PIV DEN4 formulé sans aucun excipient testé (formulation de base).

La figure 7 est un graphique représentant les résultats DLS pour une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 3, après 48 heures de stockage à 25 °C. L'axe des Y est la
5 taille moyenne Z des particules virales en nanomètre (nm). Le témoin (CTRL PB) est la formulation de base contenant la substance médicamenteuse PIV DEN4 (sans aucun excipient testé).

La figure 8 est un graphique représentant les
10 résultats DLS pour une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 3, après stockage pendant 7 jours à 25 °C. Les unités de l'axe des Y et le témoin sont comme sur la figure 7.

La figure 9 est un graphique représentant les
15 résultats de néphélométrie sur une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 3, après 48 heures de stockage à 25 °C. Les unités de l'axe des Y sont UN (unité de néphélométrie) ; UTN signifie unité de turbidité néphélométrique. Le
20 témoin (PB) est la formulation de PIV DEN4 sans aucun excipient testé (formulation de base).

La figure 10 est un graphique représentant les résultats de néphélométrie sur une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans
25 le tableau 3, après 7 jours de stockage à 25 °C. Les unités et le témoin sont comme sur la figure 9.

La figure 11 est un graphique représentant les résultats de HP-SEC-UV sur une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le
30 tableau 3, après 48 heures de stockage à 25 °C. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à la courbe

étalon. Le témoin (PB) est la formulation de PIV DEN4 sans aucun excipient testé (formulation de base).

La figure 12 est un graphique représentant les résultats de HP-SEC-UV sur une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 3, après 7 jours de stockage à 25 °C. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à la courbe étalon. Le témoin (PB) est la formulation de PIV DEN4 sans aucun excipient testé (formulation de base).

La figure 13 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 3, après 48 heures de stockage à 25 °C. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à l'antigénicité théorique qui devrait être trouvée sur la base du facteur de dilution appliqué. Le témoin (PB) est la formulation de PIV DEN4 sans aucun excipient testé (formulation de base).

La figure 14 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 3, après 7 jours de stockage à 25 °C. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à l'antigénicité théorique qui devrait être trouvée sur la base du facteur de dilution appliqué. Le témoin (PB) est la formulation de PIV DEN4 sans aucun excipient testé (formulation de base).

La figure 15 est un graphique représentant les résultats d'un IF sur une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 3, après 48 heures de stockage à 25 °C. L'axe

des Y est le % de récupération par rapport à la courbe étalon. Le témoin (PB) est la formulation de PIV DEN4 sans aucun excipient testé (formulation de base).

La figure 16 est un graphique représentant les résultats d'un IF sur une formulation de PIV DEN4 complétée avec les excipients testés énumérés dans le tableau 3, après 7 jours de stockage à 25 °C. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à la courbe étalon. Le témoin (PB) est la formulation de PIV DEN4 sans aucun excipient testé (formulation de base).

La figure 17 est un graphique représentant les résultats DLS pour une formulation tétravalente de base contenant les PIV DEN complétée avec du CaCl_2 à des concentrations variées, du MgSO_4 à des concentrations variées, ou du saccharose à 8 %, après 6 jours de stockage à 25 °C. Le témoin est la formulation tétravalente sans excipient ajouté (formulation de base). L'axe des Y est la taille moyenne Z des particules virales en nanomètre (nm).

La figure 18 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur DEN1 obtenus avec les formulations tétravalentes, comme décrites pour la figure 17. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à l'antigénicité théorique qui devrait être trouvée sur la base du facteur de dilution appliqué.

La figure 19 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur DEN2 obtenus avec les formulations tétravalentes, comme décrites pour la figure 17. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à l'antigénicité théorique qui devrait être trouvée sur la base du facteur de dilution appliqué.

La figure 20 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur DEN3 obtenus avec les formulations tétravalentes, comme décrites pour la figure 17. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à l'antigénicité théorique qui devrait être trouvée sur la base du facteur de dilution appliqué.

La figure 21 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur DEN4 obtenus avec les formulations tétravalentes, comme décrites pour la figure 17. L'axe des Y est le % de récupération par rapport à l'antigénicité théorique qui devrait être trouvée sur la base du facteur de dilution appliqué.

La figure 22 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur DEN1 obtenus avec les formulations tétravalentes sans adjuvant avec CaCl_2 (15 mM), MgSO_4 (15 mM), et du saccharose ajouté (8 % au total), pour fournir le % de récupération comparé à la substance purifiée en vrac (2 % de saccharose au total). « NC » signifie échantillon non centrifugé, et « C » signifie centrifugé.

La figure 23 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur DEN2 obtenus avec les formulations tétravalentes sans adjuvant, comme décrites pour la figure 22.

La figure 24 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur DEN3 obtenus avec les formulations tétravalentes sans adjuvant, comme décrites pour la figure 22.

La figure 25 est un graphique représentant les résultats d'un test ELISA sur DEN3 obtenus avec les

formulations tétravalentes sans adjuvant, comme décrites pour la figure 22.

La figure 26 est un graphique représentant les résultats d'une analyse DLS des formulations tétravalentes sans adjuvant, comme décrites pour la figure 22, mesurés après sept jours de stockage à différentes températures (4 °C, 25 °C, et 37 °C). « Fraîche » indique la formulation de base évaluée à T0.

La figure 27 est un graphique de la teneur en protéines des formulations tétravalentes sans adjuvant, comme décrites pour la figure 22, évaluée par SEC CLHP avec détection UV (résultats fournis sous la forme du % de récupération comparé à la teneur en protéines de la substance purifiée en vrac).

La figure 28 est un graphique des résultats d'une néphélométrie sur les formulations tétravalentes sans adjuvant comme décrites pour la figure 22. Les unités de l'axe des Y sont UN (unité néphélométrique).

La figure 29 présente les résultats d'une diffusion statique de lumière (SLS) pour mesurer les particules < 10 µm, dans des formulations tétravalentes avec Al(OH)₃ comme adjuvant.

La figure 30 présente les résultats d'une diffusion statique de lumière (SLS) pour mesurer les particules < 100 µm, dans des formulations tétravalentes avec Al(OH)₃ comme adjuvant.

La figure 31 est un graphique représentant les résultats d'une analyse DLS (moyenne Z sur l'axe des Y) d'une DS DEN4 avec MgSO₄ à divers moments temporels (T0, 1 semaine) et dans diverses conditions (22 °C, 30 °C, et

après 1, 2 ou 3 cycles de congélation/décongélation). Le témoin (CTRL) est une composition de DEN4 sans MgSO₄.

Vue d'ensemble de la vaccination contre la dengue

5 La présente divulgation concerne des formulations de compositions immunogènes. En particulier, la présente divulgation concerne des formulations de compositions, telles que des préparations vaccinales en vrac et des formulations vaccinales finies, contenant une ou
10 plusieurs souches de virus de la dengue inactivé et purifié (PIV DEN). Les formulations divulguées dans le présent document augmentent la récupération et la stabilité de PIV DEN dans les compositions immunogènes, ce qui facilite la production, le stockage et la
15 distribution de ces compositions. La récupération et la stabilité accrues des formulations divulguées dans le présent document s'appliquent à tous les stades du procédé de fabrication du vaccin, y compris aux préparations vaccinales en vrac et aux formulations
20 vaccinales finies.

 Une vaccination efficace contre les quatre sérotypes du virus de la dengue (DENV) est souhaitable, car une infection par n'importe lequel des sérotypes peut provoquer une maladie humaine, et de multiples
25 sérotypes de DENV sont souvent présents dans une seule zone géographique. En outre, le sérotype prédominant peut varier selon le moment et l'emplacement géographique.

 Plusieurs vaccins candidats à DENV atténué vivant
30 ont été décrits (Wallace et al., Curr. Opinion in Virology 3 : 352-56 (2013) ; Halstead, Vaccine 31 :

4501-07 (2013), Thomas *et al.*, Am. J. Trop. Med Hyg 88 :
73-88 (2013) ; Bauer *et al.*, Am J. Trop Med. Hyg. 14-
0625 (juillet 2015 epub), Watanaveeradej *et al.*, Am J.
Trop. Med. Hyg. 91(1) : 119-28 (2014)). Un vaccin à sous-
5 unité de DENV recombinant non répliatif a également été
décrit. Coller *et al.*, Vaccine 29 : 7267-7275 (2011).

Un vaccin tétravalent inactivé et purifié contre la
dengue (PIV TDEN) s'est avéré induire des réponses de
type anticorps protecteur contre une provocation avec
10 DENV chez les macaques rhésus. Fernandez *et al.*, Am. J.
Trop. Med. Hyg. 92(4) : 698-708 (2015).

Stabilisation de DEN4

Dans un aspect, la présente divulgation concerne
15 des procédés permettant d'augmenter la stabilité de
composition comprenant des sérotypes de virus de la
dengue inactivés et purifiés, comme PIV DEN4, par la
formulation du ou des virus inactivés de la dengue avec
des excipients améliorant la stabilité, comme décrit
20 dans le présent document.

Dans un autre aspect, la présente divulgation
concerne un procédé permettant d'améliorer la
récupération d'un virus inactivé de la dengue (ou d'une
pluralité de ceux-ci) à antigénicité préservée, dans une
25 composition le contenant, par la formulation du ou des
virus inactivés de la dengue avec des excipients
améliorant la stabilité, comme décrit dans le présent
document.

Tel qu'utilisé ici, on mesure la stabilité d'une
30 formulation de PIV de la dengue par le changement de la
taille moyenne des particules virales au cours du temps

(agrégation ou floculation du virus). Par conséquent, la stabilité d'une formulation de virus PIV de la dengue peut être évaluée en mesurant toute augmentation de la taille moyenne des particules virales au cours du temps (agrégation ou floculation). Une autre mesure de la stabilité d'une formulation de PIV de la dengue est le changement d'antigénicité au cours du temps, avec les formulations moins stables présentant une plus grande diminution de l'antigénicité. Ainsi, une formulation « moins stable » est une formulation dans laquelle la taille moyenne des particules virales augmente et/ou dont l'antigénicité diminue, par rapport à une formulation de comparaison dans des conditions identiques ou similaires et pendant des périodes de temps identiques ou similaires. Un excipient qui stabilise une formulation est un excipient qui diminue l'agrégation au cours du temps et/ou qui maintient l'antigénicité au cours du temps, par rapport à une formulation identique mais qui ne contient pas l'excipient ou qui contient l'excipient en une moindre quantité. Dans un mode de réalisation de la présente invention, les stabilités de deux formulations sont comparées après un stockage de 48 heures à 25 °C ; dans un autre mode de réalisation, les formulations sont comparées après un stockage de six jours à 25 °C, dans un autre mode de réalisation, les formulations sont comparées après un stockage de sept jours à 25 °C.

Compositions de la présente invention

Un premier aspect de la présente divulgation concerne des compositions immunogènes qui comprennent un

ou plusieurs virus de la dengue inactivés et purifiés, en combinaison avec au moins un excipient. De telles compositions peuvent être des préparations en vrac de virus de la dengue inactivé et purifié (PIV DEN) 5 produites à une échelle commerciale, et appropriées pour une formulation en compositions pharmaceutiques (par exemple, des vaccins servant à prévenir une infection par et/ou une maladie due au virus de la dengue) ; ou des formulations vaccinales finies (produit 10 médicamenteux). L'ajout d'un excipient sélectionné, tel que divulgué ici, améliore la stabilité de la composition, par rapport aux formulations qui ne contiennent pas l'excipient sélectionné ou qui contiennent l'excipient sélectionné à des taux significativement inférieurs. Ces 15 formulations contenant un excipient sélectionné possèdent comme caractéristique favorable le fait de réduire l'agrégation du virus inactivé, par exemple pendant un stockage, et/ou de maintenir l'antigénicité au cours du temps (les deux étant comparés à une 20 formulation qui ne contient pas l'excipient sélectionné ou qui contient l'excipient sélectionné à des taux significativement inférieurs. Tel qu'utilisé ici, un taux « significativement inférieur » est inférieur à la moitié, inférieur à 40 %, inférieur à 25 % ou inférieur 25 à 20 % d'un taux de comparaison.

Par conséquent, un mode de réalisation de la présente invention est une composition immunogène comprenant un ou plusieurs sérotypes de virus de la dengue inactivés et purifiés, la composition immunogène 30 comprenant en outre un excipient améliorant la stabilité choisi parmi un sucre, un acide aminé, ou un sel qui

fournit un ion divalent en solution. Les excipients appropriés comprennent le saccharose, CaCl_2 et MgSO_4 .

L'agrégation des particules virales diminue dans les compositions immunogènes de la présente invention (par rapport à des formulations ne contenant pas l'excipient améliorant la stabilité), par exemple après un stockage à 25 °C pendant 48 heures, et/ou après un stockage à 25 °C pendant six jours, et/ou après un stockage à 25 °C pendant sept jours. L'agrégation des particules virales peut être mesurée par n'importe quel procédé approprié connu dans l'art.

En variante ou en plus, l'antigénicité est préservée dans les compositions immunogènes de la présente invention (par rapport à des formulations ne contenant pas l'excipient améliorant la stabilité), par exemple après un stockage à 25 °C pendant 48 heures, et/ou après un stockage à 25 °C pendant six jours, et/ou après un stockage à 25 °C pendant sept jours. L'antigénicité peut être mesurée par tout procédé approprié connu dans l'art, comme un dosage ELISA.

En variante ou en plus, la récupération du virus de la dengue inactivé et purifié (ou des antigènes viraux) est améliorée dans les compositions immunogènes de la présente invention, par exemple plus de 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, (ou plus de 95 %) du matériel viral sont récupérés dans la préparation finale après un stockage à 25 °C pendant 48 heures, et/ou après un stockage à 25 °C pendant six jours, et/ou après un stockage à 25 °C pendant sept jours.

Dans un mode de réalisation de la présente invention, l'excipient sélectionné est le saccharose, et la

concentration finale en saccharose est présente dans la composition immunogène (par exemple, la préparation en vrac ou la formulation vaccinale finie) un niveau élevé, par exemple d'au moins ou d'environ 10 % en poids/volume (p/v), ou d'au moins ou d'environ 9 % en p/v, ou d'au moins ou d'environ 8 % en p/v, ou d'au moins ou d'environ 6 % en p/v. Dans certains modes de réalisation, la concentration finale en saccharose est située entre environ 5 % et environ 20 % en p/v ; entre environ 6 % et environ 10 % en p/v, ou entre environ 7 % et environ 9 % en p/v. Dans un aspect supplémentaire, la composition immunogène de l'invention comprend du saccharose et au moins un excipient supplémentaire choisi parmi CaCl_2 et MgSO_4 .

Dans un mode de réalisation de la présente invention, l'excipient sélectionné est CaCl_2 , et est présent dans la composition immunogène (par exemple, la préparation en vrac ou la formulation vaccinale finie) à une concentration finale d'au moins ou d'environ 5 mM, d'au moins ou d'environ 10 mM, d'au moins ou d'environ 15 mM, d'au moins ou d'environ 20 mM, d'au moins ou d'environ 30 mM, ou d'au moins ou d'environ 45 mM. Le CaCl_2 peut être fourni sous la forme de chlorure de calcium déshydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Dans certains modes de réalisation, la concentration finale en CaCl_2 est située entre environ 1 mM et environ 50 mM ; entre environ 5 mM et environ 25 mM ; ou entre environ 10 mM et environ 20 mM. Dans un mode de réalisation supplémentaire, la composition immunogène de l'invention comprend CaCl_2 et au moins un excipient supplémentaire choisi parmi le saccharose et MgSO_4 .

Dans un mode de réalisation de la présente invention, l'excipient sélectionné est $MgSO_4$, et est présent dans la composition immunogène (par exemple, la préparation en vrac ou la formulation vaccinale finie) à une concentration finale d'au moins ou d'environ 5 mM, d'au moins ou d'environ 10 mM, d'au moins ou d'environ 15 mM, d'au moins ou d'environ 20 mM, d'au moins ou d'environ 30 mM, ou d'au moins ou d'environ 45 mM. La quantité de $MgSO_4$ peut être ajustée en fonction de la quantité de l'antigène présent dans la composition, afin d'obtenir une stabilité en utilisant une quantité appropriée de $MgSO_4$. $MgSO_4$ peut être fourni sous la forme de sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Dans certains modes de réalisation, la concentration finale en $MgSO_4$ est située entre environ 1 mM et environ 50 mM ; entre environ 5 mM et environ 25 mM ; ou entre environ 10 mM et environ 20 mM. Dans un mode de réalisation supplémentaire, la composition immunogène de l'invention comprend $MgSO_4$ et au moins un excipient supplémentaire choisi parmi le saccharose et $CaCl_2$.

Un mode de réalisation de l'invention est une composition immunogène comprenant un virus inactivé et purifié des quatre sérotypes viraux de la dengue (une composition tétravalente de PIV DEN), comprenant en outre un excipient choisi parmi $CaCl_2$, $MgSO_4$, et le saccharose. Dans un mode de réalisation, l'excipient est $MgSO_4$ à une concentration finale d'au moins ou d'environ 7,5 mM, d'au moins ou d'environ 15 mM, d'au moins ou d'environ 30 mM, ou d'au moins ou d'environ 45 mM. La composition immunogène peut en outre être adjuvantée, par exemple avec un adjuvant à base d'aluminium.

Un mode de réalisation de l'invention est une composition immunogène comprenant le DEN-4 inactivé et purifié, comprenant en outre au moins un excipient choisi parmi CaCl_2 , MgSO_4 , et le saccharose. Dans un mode de réalisation, l'excipient est MgSO_4 à une concentration finale d'au moins ou d'environ 7,5 mM, d'au moins ou d'environ 15 mM, d'au moins d'environ 30 mM, ou d'au moins ou d'environ 45 mM. La composition immunogène peut en outre être adjuvantée, par exemple avec un adjuvant à base d'aluminium.

Les compositions divulguées dans le présent document peuvent comprendre un ou plus d'un sérotype du virus de la dengue. Dans un mode de réalisation, les compositions comprennent au moins DEN-4. Généralement, les compositions comprennent une pluralité de virus de la dengue issus de plus d'un sérotype, c'est-à-dire le sérotype 1 de la dengue, le sérotype 2 de la dengue, le sérotype 3 de la dengue et/ou le sérotype 4 de la dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 et/ou DEN-4, respectivement). Par exemple, la composition peut comprendre deux, trois ou quatre sérotypes différents du virus de la dengue. Dans un mode de réalisation, la composition comprend des virus de la dengue inactivés et purifiés des quatre sérotypes, et déclenche une réponse immunitaire dirigée contre chacun parmi DEN-1, DEN-2, DEN-3 et DEN-4. Le ou les virus peuvent être choisis parmi les virus de type sauvage (c'est-à-dire propagés à partir d'un ou correspondant à un virus virulent provenant d'un isolat d'origine naturelle), ou le ou les virus peuvent être choisis parmi des virus atténués, des virus recombinants et/ou des virus chimères. Une seule composition peut

comprendre un ou plusieurs virus de type sauvage, un ou plusieurs virus atténués, un ou plusieurs virus recombinants et/ou un ou plusieurs virus chimères, dans n'importe quelle combinaison.

5 Le virus purifié de la dengue peut être inactivé en utilisant un agent chimique, un agent physique et/ou un rayonnement inactivant, seul ou dans n'importe quelle combinaison. Le virus purifié de la dengue peut être inactivé par exposition au formaldéhyde, au formol, à la
10 bêtapropiolactone (BPL), au peroxyde d'hydrogène, à un rayonnement ultraviolet et à un rayonnement gamma, ou à une combinaison de l'une quelconque de ces techniques. Des descriptions de ces procédés peuvent être trouvées, par exemple, dans la demande PCT publiée
15 No. WO 2010/094 663 (publication US No. 2011 318 407), et dans la publication US No. 2007 0 031 451, qui sont incorporées à la présente à titre de référence pour illustrer des exemples de procédés d'inactivation des virus de la dengue.

20 Traditionnellement, une dose humaine de la composition immunogène contient une quantité de PIV DEN qui induit une réponse immunoprotectrice sans effets secondaires nuisibles significatifs chez un sujet typique ; l'obtention d'un effet immunoprotecteur peut
25 nécessiter l'administration de plus d'une dose à un individu, en fonction du programme sélectionné d'immunisation. Tel qu'utilisé ici, immunoprotecteur n'exige pas une protection complète contre une infection ; il signifie une diminution de la gravité ou
30 de l'incidence d'une infection, d'une maladie ou des symptômes d'une maladie. La teneur en antigène peut être

mesurée par la teneur totale en protéines en μg d'un antigène viral purifié ou partiellement purifié, ou par des procédés immunologiques, par exemple par ELISA, ou par un procédé d'immunoprécipitation quantitative, tel que l'immunodiffusion radiale.

Généralement, on s'attend à ce que chaque dose humaine comprenne au moins ou environ $0,1 \mu\text{g}$, au moins ou environ $0,2 \mu\text{g}$, au moins ou environ $0,25 \mu\text{g}$, au moins ou environ $0,3 \mu\text{g}$, au moins ou environ $0,33 \mu\text{g}$, au moins ou environ $0,4 \mu\text{g}$, au moins ou environ $0,5 \mu\text{g}$, au moins ou environ $1,0 \mu\text{g}$, au moins ou environ $2,0 \mu\text{g}$, au moins ou environ $3,0 \mu\text{g}$, au moins ou environ $4,0 \mu\text{g}$, au moins ou environ $5,0 \mu\text{g}$, au moins ou environ $8,0 \mu\text{g}$, au moins ou environ $10,0 \mu\text{g}$, ou au moins ou environ $20 \mu\text{g}$ (ou n'importe quelle quantité située entre $0,1$ et $20,0 \mu\text{g}$) de chaque sérotype de virus. Généralement, une seule dose humaine de la composition immunogène contient au plus $100 \mu\text{g}$ de chaque sérotype de virus, par exemple, au plus $90 \mu\text{g}$, ou au plus $80 \mu\text{g}$, ou au plus $75 \mu\text{g}$, ou au plus $70 \mu\text{g}$, ou au plus $60 \mu\text{g}$, ou au plus $50 \mu\text{g}$, ou au plus $40 \mu\text{g}$, ou au plus $30 \mu\text{g}$, ou au plus $20 \mu\text{g}$, ou au plus $10 \mu\text{g}$, ou au plus $8 \mu\text{g}$, ou au plus $4 \mu\text{g}$, ou au plus $2 \mu\text{g}$ (ou n'importe quelle quantité située entre 2 et $100 \mu\text{g}$) de chaque sérotype de virus. Dans certains modes de réalisation, la composition immunogène pour une utilisation chez les humains est une formulation liquide, par exemple une solution ou une suspension. Dans d'autres modes de réalisation, la composition est préparée, lyophilisée et remise en suspension avant d'être administrée au sujet.

La quantité de PIV DEN utilisée dans une composition immunogène est choisie en fonction de la population de sujets à laquelle elle est destinée (par exemple, des adultes, des nourrissons). Une quantité optimale pour
5 une composition particulière peut être déterminée grâce à des études classiques impliquant l'observation des titres d'anticorps et d'autres réponses chez les sujets.

Dans certains modes de réalisation de la présente invention, la composition immunogène comprend un ou
10 plusieurs sérotypes de PIV DENV et un adjuvant. L'adjuvant peut être un sel d'aluminium. Les sels d'aluminium appropriés comprennent l'hydroxyde d'aluminium hydraté ($\text{Al}(\text{OH})_3$), le phosphate d'aluminium (AlPO_4), l'hydroxyde d'oxyde d'aluminium ($\text{AlO}(\text{OH})$) et
15 l'hydroxyphosphate d'aluminium. Dans certains modes de réalisation, le virus de la dengue inactivé et purifié est adsorbé sur les sels d'aluminium. Quand une pluralité de virus de la dengue est incluse dans la composition, chacun peut être adsorbé sur le même sel d'aluminium, ou
20 différents virus peuvent être adsorbés sur des sels d'aluminium différents. Quand de l'aluminium est présent, la quantité est généralement située entre environ 100 μg et 1 mg, comme d'environ 100 μg , à environ 200 μg , à environ 500 μg , à environ 750 μg , ou d'environ 1000 μg ,
25 comme environ 500 μg par dose. Dans les formulations dans lesquelles un sel d'aluminium est utilisé, le ou les virus de la dengue inactivés et purifiés peuvent être préalablement adsorbés sur le sel d'aluminium avant la formulation dans les compositions divulguées ici.
30 Alternativement, le sel d'aluminium peut être ajouté à une composition liquide, ou inclus dans le liquide dans

lequel une composition immunogène lyophilisée est remise en suspension.

L'adjuvant peut alternativement être une formulation liposomique d'immunostimulants. Une
5 formulation liposomique appropriée de ce type est le système adjuvant AS01 (GlaxoSmithKline), qui contient le monophosphoryl-lipide A (MPL, un dérivé lipopolysaccharidique (LPS) détoxifié) et le QS21 (une saponine extraite de l'écorce de l'arbre *Quillaja saponaria*).
10 Voir, par exemple, les documents WO 94/00 153 (PCT/EP 93/01 524), WO 94/21 292 (PCT/EP 94/00 818), WO 07/068 907 (PCT/GB 06/004 634), WO 96/33 739 (PCT/EP 96/01 464)). L'adjuvant peut être une émulsion huile-dans-eau, comme le système adjuvant AS03
15 (GlaxoSmithKline) contenant de l'alpha-tocophérol et du squalène (voir, par exemple, les documents WO 95/17 210 (PCT/EP 94/04 246), WO 08/043 774 (PCT/EP 07/060 743)). La composition peut être sans aluminium, ou peut comprendre à la fois un adjuvant de type sel d'aluminium
20 et un autre adjuvant non-alun (comme un lipopolysaccharide, une saponine, ou un oligonucléotide). Dans un mode de réalisation, la composition immunogène comprend un PIV DENV des quatre sérotypes, et un adjuvant (par exemple, un vaccin adjuvanté
25 tétravalent à base de PIV DEN). Dans un mode de réalisation, le vaccin adjuvanté tétravalent à base de PIV DEN comprend un adjuvant à base d'aluminium, comme $Al(OH)_3$.

Les compositions immunogènes divulguées ici peut
30 comprendre en outre un ou plusieurs tensioactifs ; de nombreux tensioactifs sont connus dans l'art, pour une

utilisation dans les formulations pharmaceutiques. Chaque tensioactif de ce type est choisi de manière à être approprié pour une administration à un sujet, en particulier un sujet humain. Dans certains modes de réalisation, le tensioactif est choisi de manière à être approprié pour une administration parentérale, par exemple pour une administration intramusculaire, sous-cutanée, transcutanée ou intradermique. Les tensioactifs appropriés pour les compositions de dengue divulguées ici comprennent les tensioactifs de type poloxamère, les tensioactifs de type polysorbate, les tensioactifs de type octoxinol, les tensioactifs de type polidocanol, les tensioactifs de type polyoxylstéarate, les tensioactifs de type huile de ricin polyoxylée, les tensioactifs de type N-octyl-glucoside, le 15-hydroxystéarate de macrogol, et leurs combinaisons. Dans certains modes de réalisation, les tensioactifs de type poloxamère sont particulièrement appropriés pour les formulations dans lesquelles le ou les virus de la dengue inactivés et purifiés ne sont pas adsorbés sur un sel d'aluminium.

Les tensioactifs de type poloxamère sont des copolymères linéaires de polyéthylène-polypropylène glycol. Dans le commerce, ils sont souvent appelés tensioactifs pluroniques. Dans certains modes de réalisation, le tensioactif de type poloxamère est choisi parmi un copolymère de polyéthylène-polypropylène glycol ayant un poids moléculaire moyen d'au moins environ 1000 kD, et un poids moléculaire moyen d'au plus environ 15 000 kD. Dans un mode de réalisation spécifique, la composition immunogène est formulée avec

un copolymère de polyéthylène-poly-propylène glycol, le poloxamère 188, qui est vendu dans le commerce sous les noms commerciaux de Pluronic™ F-68, Lutrol™ F-68, et Kolliphor™ P188, qui possède un poids moléculaire moyen
5 de 8600 kD, avec un poids moléculaire de polyoxypropylène de 1800 g/mole et une teneur en polyoxyéthylène de 80 %.

Les compositions immunogènes divulguées ici peuvent comprendre en outre un ou plusieurs agents tampons. Le
10 ou les agents tampons sont généralement choisis de manière à maintenir le pH de la composition à un pH supérieur ou égal au pH neutre, par exemple à un pH égal ou proche du pH physiologique de 7,4, et dans certains cas, à un pH égal ou supérieur à 7,5, comme égal ou
15 supérieur à 8,0, égal ou supérieur à 8,3, ou égal ou supérieur à 8,5.

Les agents tampons appropriés comprennent les carbonate, phosphate, citrate, lactate, gluconate et tartrate, ainsi que des agents tampons organiques plus
20 complexes. Dans certains exemples, l'agent tampon comprend un agent tampon phosphate qui contient du phosphate de sodium et/ou du phosphate de potassium. Généralement, un tel agent tampon, ou système tampon, comprend à la fois du phosphate de sodium et du phosphate
25 de potassium à un rapport choisi de manière à obtenir le pH souhaité. Dans un autre exemple, l'agent tampon contient du tris(hydroxyméthyl)aminométhane, ou « Tris », formulé de manière à obtenir le pH souhaité. Des procédés de formulation de tampon pour obtenir le pH souhaité
30 sont bien connus de l'homme du métier, et une composition

appropriée peut être déterminée sans expérimentation excessive sur la base du pH souhaité.

Les compositions immunogènes (par exemple, les préparations en vrac et les formulations vaccinales finies) divulguées dans le présent document peuvent comprendre des composants supplémentaires, comme un ou plusieurs sels minéraux, par exemple pour modifier ou maintenir la tonicité dans une plage souhaitée, comme à l'isotonie ou proche de l'isotonie. La quantité appropriée diffère en fonction des autres composants dans la formulation, et peut être déterminée sans expérimentation excessive par l'homme du métier. Un de ces sels minéraux appropriés est le NaCl. D'autres sels minéraux et ions peuvent également être utilisés, par exemple des sels de potassium, de calcium, de magnésium, de manganèse, de zinc, tout comme d'autres sels et ions pharmaceutiquement acceptables. Les sels pharmaceutiquement acceptables et leur sélection sont discutés en détail, par exemple, dans *Pharmaceutical Salts : Properties, Selection, and Use*, 2ème édition révisée, P. Heinrich Stahl (Editeur), Camille G. Wermuth (Editeur), Wiley, 2011.

Les compositions immunogènes (par exemple, les préparations en vrac et les formulations vaccinales finies) divulguées dans le présent document peuvent comprendre en outre un ou plusieurs excipients de type sucre ou polyol, choisis par exemple dans le groupe constitué par : le saccharose, le tréhalose, le mannose, le mannitol, le raffinose, le lactitol, le sorbitol et l'acide lactobionique, le glucose, le maltulose, l'iso-maltulose, le lactulose, le maltose, le lactose, l'iso-

maltose, le maltitol, la palatinite, le stachyose, le
mélézitose, le dextrane ou une combinaison de ceux-ci.
Dans un mode de réalisation spécifique, l'excipient
comprend du saccharose. Facultativement, le sucre ou le
5 polyol peut être utilisé en combinaison avec un acide
aminé, comme la glycine, l'alanine, l'arginine, la
lysine et/ou la glutamine.

Dans un mode de réalisation, la composition
immunogène comprend 5 mM de Tris, 150 mM de NaCl,
10 facultativement avec un tensioactif, par exemple le
poloxamère 188 et un sucre, par exemple le saccharose à
2 % en poids/volume.

Procédés de formulation

15 Un autre aspect de la présente divulgation concerne
des procédés de formulation de compositions immunogènes
(par exemple, des préparations en vrac ou des
formulations vaccinales finies) comprenant un ou
plusieurs virus de la dengue inactivés et purifiés. De
20 tels procédés comprennent : la fourniture d'une solution
et le mélange avec la solution d'un ou de plusieurs virus
de la dengue inactivés et purifiés. La solution peut
contenir un ou plusieurs agents tampons et un ou
plusieurs tensioactifs. Dans certains modes de
25 réalisation, le ou les virus de la dengue inactivés et
purifiés sont adsorbés sur un sel d'aluminium (par
exemple, pour produire une préparation en vrac
préalablement adsorbée d'un virus inactivé de la dengue)
avant le mélange avec la solution. Généralement, un seul
30 sérotype ou une seule souche de virus de la dengue
inactivé et purifié est adsorbé sur un sel d'aluminium

(par exemple, l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium ou l'hydroxyphosphate d'aluminium) pour produire une mono-substance en vrac préalablement adsorbée. Pour produire une composition immunogène multivalente, des mono-substances en vrac de différents sérotypes de la dengue sont ensuite combinées au rapport souhaité (par exemple, 1/1/1/1 sur une base en poids, ou ajusté sur la base de l'immunogénicité relative) avec la solution contenant l'agent tampon et le tensioactif.

10 Généralement, le ou les virus de la dengue inactivés et purifiés sont ajoutés à une solution appropriée (dans une formulation finale) pour une administration parentérale. Dans certains modes de réalisation, la solution est une solution isotonique et comprend de l'eau stérile exempte d'endotoxine. Comme divulgué dans le présent document, la solution comprend également un ou plusieurs excipients pour augmenter la stabilité pendant le stockage, comme un sucre, un acide aminé ou un ion bivalent. Les excipients appropriés pour augmenter la stabilité comprennent le saccharose, CaCl_2 le MgSO_4 .

20 Dans certains modes de réalisation, après l'ajout du virus de la dengue inactivé et purifié à la solution contenant le tampon et le tensioactif (et facultativement des composants supplémentaires) comme décrit ici, la composition immunogène formulée est stockée sous forme de liquide en vrac, par exemple à température ambiante, à 0-4 °C, ou sous 0 °C (comme à ou à environ -20 °C, ou à ou à environ -70 °C à -80 °C), avant le remplissage final dans la forme de produit

30 médicamenteux.

Un exemple de procédé de formulation d'une composition immunogène en vrac à base de PIV DEN, tétravalente et adjuvantée, selon la présente invention est comme suit :

5 sous agitation douce, ajouter de l'eau stérile pour injection :

 du saccharose pour obtenir une concentration finale de 2 % en poids/volume ;

 du Tris pour obtenir une concentration finale de
10 5 mM (dans une formulation alternative, le Tris est fourni à une concentration finale de 3,5 mM) ;

 du NaCl pour obtenir une concentration finale de 150 mM ;

 le mélange pluronique(TM)/lutrol(TM) F68 pour
15 obtenir une concentration finale de 0,10 % en poids/volume ;

 du MgSO₄ pour obtenir une concentration finale de 15 mM (dose élevée) ou de 7,5 mM (dose basse) ;

 de l'Al(OH)₃ pour obtenir une concentration finale
20 de 1000 µg/ml (dose élevée) ou de 500 µg/ml (dose basse) ;

 après agitation pendant 15 à 30 minutes, ajouter

 le PIV DEN1 pour fournir 8 µg/ml (dose élevée) ou 4 µg/ml (dose basse)

 le PIV DEN2 pour fournir 8 µg/ml (dose élevée) ou
25 4 µg/ml (dose basse)

 le PIV DEN3 pour fournir 8 µg/ml (dose élevée) ou 4 µg/ml (dose basse)

 le PIV DEN4 pour fournir 8 µg/ml (dose élevée) ou 4 µg/ml (dose basse)

30 arrêter l'agitation 10 à 15 minutes après l'ajout du dernier PIV DEN ;

vérifier le pH et l'ajuster si nécessaire à 7,9 +/- 0,3

stocker en vrac jusqu'au remplissage.

Dans le procédé ci-dessus, l'adjuvant à base
5 d'aluminium est ajouté à la composition avant l'ajout
des PIV DEN ; dans un procédé alternatif, les virus PIV
DEN sont préalablement adsorbés sur l'adjuvant à base
d'aluminium. D'autres exemples de formulations
appropriées pour les PIV DEN peuvent être trouvés dans
10 le document WO 2012/160 199.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de
formulation implique ensuite la lyophilisation de la
solution (par exemple, la préparation en vrac contenant
le ou les virus de la dengue inactivés et purifiés) pour
15 produire une composition lyophilisée. Dans les modes de
réalisation impliquant la lyophilisation de la
composition immunogène, par exemple à des fins de
stockage et/ou de distribution, la composition
lyophilisée est généralement remise en suspension dans
20 une quantité appropriée, par exemple 0,05 à 2 ml,
généralement entre 0,5 et 1,5 ml, par exemple 0,5 ou 1,0
ou 1,5 ml, d'une solution pharmaceutiquement acceptable,
tel que de l'eau stérile pour injection exempte
d'endotoxine, avant l'administration. Facultativement,
25 la solution pharmaceutiquement acceptable utilisée pour
la reconstitution peut comprendre un adjuvant, tel que
divulgué ici.

La présente invention fournit des formulations et
des vaccins pour une utilisation en médecine, plus
30 précisément en tant que procédé de traitement d'un
mammifère, en particulier un humain, souffrant d'une

infection par la dengue ou risquant d'être infecté par la dengue. Il est également fourni l'utilisation des formulations et des vaccins de la présente invention dans la préparation d'un produit immunoprophylactique et/ou immunothérapeutique pour le traitement ou la prophylaxie d'une infection par la dengue (par exemple, un vaccin prophylactique ou un vaccin immunothérapeutique).

Les compositions vaccinales finies de l'invention peuvent être lyophilisées ou sous forme aqueuse, des solutions ou des suspensions. Les formulations liquides permettent aux compositions d'être administrées directement à partir de leur forme conditionnée, sans qu'il soit nécessaire de les reconstituer dans un milieu aqueux. Dans certains modes de réalisation, un adjuvant peut être mélangé avec l'ingrédient actif du vaccin au moment de l'administration clinique, par conséquent l'adjuvant et l'antigène peuvent être maintenus séparés dans un vaccin conditionné ou distribué, prêts pour une formulation finale au moment de l'administration. Dans d'autres modes de réalisation, un adjuvant est mélangé avec l'antigène pendant la préparation, par conséquent la composition est conditionnée sous une forme adjuvantée.

Les compositions vaccinales finies peuvent être conditionnées de toute manière appropriée, par exemple dans des flacons ou des seringues préremplies. Les seringues peuvent être fournies avec ou sans aiguille. Une seringue contient habituellement une seule dose de la formulation vaccinale, tandis qu'un flacon peut comprendre une seule dose ou de multiples doses. Dans un

mode de réalisation, la dose est pour un humain. Dans un mode de réalisation supplémentaire, la dose est pour un adulte, un adolescent, un tout petit, un nourrisson ou un humain âgé de moins d'un an. Les posologies efficaces peuvent être établies en utilisant des procédés connus dans l'art. Dans un mode de réalisation, la posologie est de 0,1 µg à 10,0 µg d'antigène pour chaque sérotype du virus de la dengue, de 0,5 µg à 8,0 µg d'antigène pour chaque sérotype du virus de la dengue, ou de 1 µg à 4,0 µg d'antigène pour chaque sérotype du virus de la dengue.

Bien que la composition vaccinale finie puisse être administrée par différentes voies, l'administration la plus courante est une administration intramusculaire, sous-cutanée ou intradermique. Généralement, la composition vaccinale finie est administrée à une dose efficace pour produire des anticorps de neutralisation dirigés contre chacun des sérotypes de DENV contenus dans la composition. La quantité de PIV à administrer dépend du sujet à traiter, de la capacité du système immunitaire du sujet à synthétiser des anticorps, et du degré souhaité de protection. Les quantités précises du vaccin à administrer peuvent dépendre du jugement du médecin traitant et peuvent être spécifiques à chaque sujet. Le vaccin peut être donné selon un programme à une seule dose, ou de préférence un programme à plusieurs doses dans lequel une phase primaire de vaccination est suivie de doses supplémentaires données à des intervalles de temps ultérieurs pour maintenir et/ou renforcer la réponse immunitaire souhaitée.

La présente divulgation concerne la formulation de compositions immunogènes, telles que des préparations vaccinales en vrac et des formulations vaccinales finies, contenant le virus de la dengue inactivé et purifié de sérotype 4. Les formulations divulguées dans le présent document augmentent la stabilité des compositions immunogènes (par exemple, un vaccin en vrac ou fini comprenant PIV DEN4), ce qui facilite la fabrication, la production, le stockage et la distribution des vaccins comprenant le PIV DEN4.

Un premier aspect de la présente divulgation concerne des compositions immunogènes (par exemple, des compositions vaccinales en vrac et des formulations vaccinales finies) qui comprennent DEN4 inactivé et purifié, en combinaison avec un agent tampon, un tensioactif et un excipient améliorant la stabilité. Comme décrit dans le présent document, les excipients sélectionnés se sont avérés améliorer la stabilité du virus DEN4 inactivé à antigénicité préservée dans une formulation, par rapport aux formulations ne contenant pas l'excipient sélectionné. Les formulations de virus PIV DEN4 contenant un ou plusieurs excipients sélectionnés tels que décrits dans le présent document (un agent ou excipient « améliorant la stabilité ») possèdent comme caractéristiques favorables de limiter l'augmentation de la taille moyenne des virus au cours du temps, et/ou de limiter la réduction de l'antigénicité au cours du temps (par exemple, pendant le stockage), par rapport aux formulations ne contenant pas le ou les excipients sélectionnés.

L'excipient améliorant la stabilité sélectionné peut être ajouté à un moment quelconque ou à plusieurs moments lors de la préparation du produit vaccinal fini, par exemple ajouté à un sérotype individuel de DS avant
5 l'ajout d'un quelconque adjuvant ; ajouté à des sérotypes adjuvantés individuels, notamment ceux adsorbés sur un adjuvant de type alun ; ajouté à une composition comprenant de multiples sérotypes, avec ou sans autres excipients ou adjuvants ; ou ajouté à un
10 produit médicamenteux vaccinal par ailleurs complet.

Les compositions divulguées dans le présent document peuvent comprendre seulement un unique sérotype de virus de la dengue (une composition monovalente contenant, par exemple, DEN-4), ou les compositions
15 peuvent comprendre plus d'un sérotype de la dengue (multivalent). Dans un mode de réalisation, la composition comprend une pluralité de virus de la dengue provenant de plus d'un sérotype. Par exemple, la composition peut comprendre un, deux ou trois sérotypes
20 de la dengue en plus de DEN-4. Dans un exemple spécifique, la composition comprend quatre sérotypes de virus de la dengue inactivés et purifiés (DEN-1, DEN-2, DEN-3 et DEN-4), et la composition est capable de déclencher une réponse immunitaire spécifique pour chacun des quatre
25 sérotypes chez un sujet humain. Dans un autre mode de réalisation, la composition comprend au moins DEN-4.

Les virus de la dengue utilisés peuvent être choisis parmi n'importe quelle souche appropriée (ou souches) de virus de la dengue. Par exemple, une souche de virus
30 peut être choisie pour chaque sérotype, qui est choisi sur la base de sa conformité à une séquence définie (par

exemple, consensus) pour le sérotype. Un tel virus peut être d'origine naturelle ou synthétique. Par exemple, une souche de virus peut être choisie pour être en corrélation avec une souche prévalente (par exemple, une souche d'origine naturelle ou « de type sauvage ») dans la zone ou la population dans laquelle le vaccin est destiné à être administré. Une autre option consiste à choisir des souches appropriées pour chaque sérotype sur la base de la disponibilité ou d'une expérience antérieure. Des souches de dengue sont décrites dans le brevet US No. 6 254 873, qui est incorporé à titre de référence à la présente. Des souches supplémentaires sont divulguées, par exemple, dans le brevet US No. 7 226 602, qui est également incorporé à la présente à titre de référence. D'autres souches peuvent être trouvées, par exemple, dans la base de données de génomes viraux VBRC (disponible à l'adresse http://athena.bioc.uvic.ca/organisms/Flaviviridae/Dengue/Curated_genes), et la base de données du virus de la dengue (disponible à l'adresse <http://www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/ProjectInfo.html>).

Dans le contexte d'un vaccin à virus de la dengue inactivé et purifié, des souches virulentes ou atténuées peuvent être utilisées. Généralement, les souches virulentes se propagent à un titre plus élevé chez les cellules hôtes, ce qui facilite la production à l'échelle commerciale. Cependant, les souches virulentes doivent être manipulées avec précaution. Les souches atténuées, par exemple développées par adaptation de la production dans des cellules cultivées et sélection pour obtenir

une virulence réduite et/ou une réplication réduite dans les vecteurs de la dengue que sont les moustiques, requièrent moins de précautions lors de leur manipulation mais peuvent être plus difficiles à
5 produire. Des exemples de souches atténuées appropriées pour une utilisation dans le contexte d'une composition immunogène contenant un virus de la dengue inactivé sont décrits dans le document WO 2000/057 907 et le brevet US No. 6 638 514, et dans le document WO 2000/058 444 et le
10 brevet US No. 6 613 556, et les documents WO 2002/066 621 (publication US No. 2004 052 818), WO 2000/057 904 (brevet US No. 6 528 065, WO 2000/057 908, WO 2000/057 909 (brevet US No. 6 511 667) ; WO 2000/057 910 (brevet US
15 No. 6 537 557), WO 2002/095 075 (par exemple, le brevet US No. 7 226 602) et WO 2002/102 828 (brevet US No. 7 569 383), qui sont incorporés à la présente à titre de référence.

Par conséquent, le ou les virus inactivés et
20 purifiés peuvent être choisis parmi des virus de type sauvage (c'est-à-dire propagés à partir d'un ou correspondant à un virus virulent provenant d'un isolat d'origine naturelle), ou le ou les virus peuvent être choisis parmi des virus atténués. Un virus sélectionné
25 peut être un virus recombinant. Par exemple, un virus recombinant peut être un virus chimère, par exemple un virus ayant un acide nucléique provenant d'un virus de la dengue et un acide nucléique provenant d'un autre flavivirus, comme un virus de la dengue différent, un
30 virus de la fièvre jaune, ou un virus de l'encéphalite japonaise. Généralement, un virus chimère comprend une

protéine M de la dengue et/ou une protéine E de la dengue. Des exemples de virus chimères de la dengue peuvent être trouvés, par exemple, dans les documents WO 98/37 911 (brevets US No. 6 696 281 ; No. 6 962 708), WO 96/40 933
5 et WO 2001 060 847 (brevets US No. 7 094 411 ; No. 7 641 909 ; No. 8 025 887) et EP 1 159 968. Des procédés de production de tels virus chimères de la dengue peuvent également être trouvés dans le document
10 WO 03/101 397. Une unique composition peut comprendre un ou plusieurs virus de type sauvage, un ou plusieurs virus atténués, un ou plusieurs virus recombinants et/ou un ou plusieurs virus chimères, dans n'importe quelle combinaison.

15 Procédé de production de DENV

Des procédés de production de virus de la dengue sont connus dans l'art, et sont décrits suffisamment en détail pour guider l'homme du métier, par exemple dans la demande PCT publiée No. WO 2010/094 663, publication
20 US No. 2011 318 407. Le virus peut être propagé dans des conditions ne faisant pas appel à des animaux, c'est-à-dire produit sans l'utilisation d'un quelconque matériel d'origine animale (par exemple, du sérum de bovin fœtal). Des procédés de production de virus dans des conditions
25 sans sérum peuvent également être trouvés, par exemple, dans la publication US No. 2006 0 183 224. Les divulgations de ces demandes de brevet publiées sont incorporées à la présente à titre de référence pour fournir des détails supplémentaires concernant la
30 propagation et la purification des virus de la dengue à des fins d'inclusion dans les compositions immunogènes

(par exemple, des préparations vaccinales en vrac et finies) divulguées ici. Dans un mode de réalisation, le milieu contenant le virus est clarifié par filtration, concentré, et le milieu est échangé (par exemple, par 5 ultrafiltration et diafiltration) pour un tampon approprié (par exemple, une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), 125 mM de citrate, pH 7,6). Des solutions tampons appropriées peuvent être choisies par l'homme du métier. La concentration initiale et 10 l'échange de tampon peuvent être suivis d'une filtration supplémentaire et d'une chromatographie d'exclusion stérique.

Avant l'inactivation du virus, un tensioactif, comme un tensioactif de type poloxamère tel que divulgué 15 dans le présent document, et choisi à des fins d'inclusion dans la composition immunogène (par exemple, une préparation en vrac et/ou une formulation vaccinale finie), peut être ajouté à la composition virale tamponnée. Alternativement, le tensioactif peut être 20 ajouté après l'inactivation. Le virus de la dengue inactivé et purifié est ensuite stérilisé par filtration pour produire une préparation en vrac de virus inactivé de la dengue.

25 Termes et définitions

Toutes les références divulguées dans le présent document sont incorporées à titre de référence dans leur globalité.

Pour faciliter l'examen des divers modes de 30 réalisation de la présente divulgation, les explications suivantes de termes sont fournies. Des termes et

explications supplémentaires peuvent être fournis dans le contexte de la présente divulgation.

Sauf indication contraire, tous les termes techniques et scientifiques utilisés dans le présent document ont les mêmes significations que celles couramment comprises par l'homme du métier auquel la présente divulgation appartient. Les définitions de termes courants en biologie moléculaire peuvent être trouvées dans Benjamin Lewin, *Genes V*, publié par Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9) ; Kendrew et al. (éds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publié par Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9) ; et Robert A. Meyers (éd.), *Molecular Biology and Biotechnology : a Comprehensive Desk Reference*, publié par VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Les définitions de termes courants utilisés en vaccinologie peuvent être trouvées dans *Vaccines 6th Edition*, Plotkin, Orenstein and Offit (Eds.), Saunders, 2012.

Les termes singuliers « un », « une », « le » et « la » comprennent les référents pluriels, sauf si le contexte ne l'indique clairement autrement. De manière similaire, le mot « ou » est destiné à inclure « et », sauf si le contexte ne l'indique clairement autrement. Le terme « pluralité » fait référence à deux ou plus de deux. En outre, les limitations numériques données par rapport aux concentrations ou aux taux d'une substance, telle qu'un antigène, sont destinées à être approximatives. Ainsi, (par exemple) quand il est indiqué qu'une concentration est au moins de 200 pg, il est prévu qu'il soit compris que la concentration est au

moins d'approximativement (ou « d'environ » ou « ~ »)
200 pg.

Bien que des procédés et des matériels similaires
ou équivalents à ceux décrits dans le présent document
5 puissent être utilisés dans la pratique ou le test de la
présente divulgation, des procédés et matériels
appropriés sont décrits dans le présent document. Le
terme « comprend » signifie « inclut ». Par conséquent,
sauf si le contexte ne l'exige autrement, on comprendra
10 que le mot « comprend » et les variations telles que
« comprendre » et « comprenant » impliquent l'inclusion
d'un composé indiqué ou d'une composition indiquée (par
exemple, un acide nucléique, un polypeptide, un antigène)
ou une étape indiquée, ou un groupe de composés ou
15 d'étapes, mais pas l'exclusion d'un quelconque autre
composé, composition, étape ou groupe de ceux-ci.
L'abréviation « e.g. » est dérivée du latin *exempli
gratia*, et est utilisée dans le présent document pour
indiquer un exemple non limitatif. Par conséquent,
20 l'abréviation « e.g. » est synonyme du terme « par
exemple ».

Telle qu'utilisée dans le présent document, une
substance médicamenteuse (DS) fait référence à un
ingrédient pharmaceutique actif (notamment un composant
25 vaccinal actif, tel qu'un antigène ou un virus inactivé),
c'est-à-dire un matériel qui exerce une action
physiologique quand il est administré à un sujet humain
(y compris l'induction d'une réponse immunitaire). Quand
elle est fabriquée et/ou stockée dans des préparations
30 de grande quantité, une DS peut être appelée préparation
en vrac, substance purifiée en vrac (PB), intermédiaire

en vrac ou (dans le cas des vaccins) vaccin en vrac, composant vaccinal en vrac ou antigène en vrac.

Pour fournir un produit médicamenteux fini (DP) (notamment un vaccin fini), une ou plusieurs substances
5 médicamenteuses sont généralement formulées avec des ingrédients inactifs (par exemple, des véhicules, des tampons, des excipients, des liants). Des ingrédients inactifs sont inclus dans la formulation pour diverses raisons, par exemple pour faciliter la fabrication,
10 améliorer la stabilité ou améliorer d'autres caractéristiques d'un produit. Telle qu'utilisée dans le présent document, une formulation vaccinale finie ou finale est considérée comme étant un produit médicamenteux.

15 Une substance médicamenteuse virale de la dengue inactivée et purifiée (ou un ingrédient actif) fait référence à un virus de la dengue sous la forme antigénique finale, par rapport à la purification et à l'inactivation, et destiné à être administré à un sujet.

20 Une préparation en vrac ou une formulation en vrac d'une substance médicamenteuse à base de virus PIV DEN peut être davantage transformée, par exemple par dilution, concentration, comme par lyophilisation et remise en suspension, et/ou conditionnée, par exemple dans des
25 flacons ou seringues multidose et monodose à des fins d'administration comme composition ou vaccin immunogène.

Tel qu'utilisé dans le présent document, un « adjuvant » est un agent qui augmente la production d'une réponse immunitaire spécifique d'un antigène par
30 rapport à l'administration de l'antigène en l'absence de l'agent. Les adjuvants courants comprennent les

adjuvants contenant de l'aluminium qui comprennent des suspensions de minéraux (ou de sels minéraux, comme l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium, l'hydroxyphosphate d'aluminium) sur lesquelles l'antigène est adsorbé. D'autres adjuvants comprennent un ou plusieurs composants immunostimulants qui contribuent à la production d'une réponse immunitaire renforcée spécifique d'un antigène. Les composants immunostimulants comprennent les émulsions d'huile et d'eau, telles qu'une émulsion huile-dans-eau et huile-dans-eau, (et leurs variantes, notamment les émulsions doubles et les émulsions réversibles), les liposaccharides, les lipopolysaccharides, les acides nucléiques immunostimulants (comme les oligo-nucléotides CpG), les liposomes, les agonistes des récepteurs de type Toll (en particulier, les agonistes de TLR2, TLR4, TLR7/8 et TLR9), et diverses combinaisons de ces composants. Les adjuvants peuvent comprendre des combinaisons de composants immuno-stimulants.

Tel qu'utilisé dans le présent document, un « antigène » fait référence à une substance, notamment un peptide et une protéine (comme une glycoprotéine), qui induit une réponse immunitaire chez un mammifère, notamment un humain.

Tel qu'utilisé dans le présent document, un « agent tampon » est un composé ou une composition qui seul ou en combinaison augmente la capacité d'une solution à maintenir ou à résister à un changement de pH quand un acide ou une base est ajouté. Le terme agent tampon englobe une grande variété de composés et de compositions, habituellement des acides faibles ou des bases faibles

qui, quand ils sont présents en solution avec leur base ou acide conjugué, peuvent être utilisés pour maintenir le pH à une valeur souhaitée ou dans une plage souhaitée.

Telle qu'utilisée dans le présent document, une
5 quantité « en vrac » fait référence à un volume supérieur au volume d'un produit médicamenteux fini et commercialisé. Par conséquent, un « composant vaccinal en vrac » fait référence à une DS vaccinale ou à un ingrédient actif qui est maintenu, contenu ou stocké
10 dans un volume supérieur au volume du produit vaccinal fini. La concentration d'un ingrédient actif vaccinal (tel qu'un virus PIV DEN) dans une préparation en vrac est généralement supérieure à la concentration de l'ingrédient actif dans le produit vaccinal fini. Une
15 « substance en vrac » est un produit intermédiaire lors de la fabrication commerciale des vaccins. Un composant vaccinal en vrac peut être univalent (monovalent), c'est-à-dire qu'il contient un ingrédient actif vaccinal (comme un unique sérotype de virus de la dengue),
20 bivalent ou multivalent. Une substance en vrac peut contenir un antigène ou PIV purifié à une concentration différente de celle présente dans une formulation vaccinale finale (finie) (la formulation destinée à être distribuée, vendue dans le commerce ou utilisée en
25 clinique). Les formulations vaccinales finales peuvent être polyvalentes, en comprenant de multiples sérotypes de PIV de la dengue (par exemple, ce peut être un mélange de substances PIV en vrac à multiples sérotypes), et peuvent comprendre des antigènes provenant de pathogènes
30 supplémentaires. Les substances en vrac peuvent être

stockées jusqu'à leur utilisation pour la préparation de la formulation vaccinale finale.

Une « réponse immunitaire » est une réponse d'une cellule du système immunitaire, telle qu'un lymphocyte B, un lymphocyte T ou un monocyte, à un stimulus. Une réponse immunitaire peut être une réponse de type lymphocyte B, qui entraîne la production d'anticorps spécifiques, tels que des anticorps de neutralisation spécifiques d'un antigène. Une réponse immunitaire peut également être une réponse de type lymphocyte T, telle qu'une réponse CD4+ ou une réponse CD8+. Dans certains cas, la réponse est spécifique d'un antigène particulier (c'est-à-dire une « réponse spécifique d'un antigène »). Si l'antigène provient d'un pathogène, la réponse spécifique d'un antigène est une « réponse spécifique d'un pathogène ». Une « réponse immunitaire protectrice » est une réponse immunitaire qui inhibe une fonction ou activité nuisible d'un pathogène, réduit l'infection par un pathogène ou diminue les symptômes (y compris la mort) qui résultent de l'infection par le pathogène. Une réponse immunitaire protectrice peut être mesurée, par exemple, par l'inhibition de la réplication virale ou de la formation des plaques dans un essai de réduction de plaques ou un essai de neutralisation par ELISA, ou en mesurant la résistance à une provocation avec le pathogène *in vivo*.

Telle qu'utilisée dans le présent document, une « composition immunogène » est une composition de matière appropriée pour être administrée à un sujet humain ou animal (par exemple, dans un environnement clinique ou expérimental), et qui est capable de

déclencher une réponse immunitaire spécifique chez un sujet auquel elle est administrée, par exemple dirigée contre un pathogène, tel que le virus de la dengue. En tant que telle, une composition immunogène comprend un ou plusieurs antigènes (par exemple, un virus purifié entier ou des sous-unités antigéniques, par exemple des polypeptides de celui-ci) ou des épitopes antigéniques. Une composition immunogène peut également comprendre un ou plusieurs composants supplémentaires, tels qu'un excipient, un support et/ou un adjuvant. Dans certains cas, les compositions immunogènes sont administrées pour déclencher une réponse immunitaire qui protège le sujet contre les symptômes ou les affections induites par un pathogène. Dans le contexte de la présente divulgation, on comprendra que le terme composition immunogène englobe les compositions qui sont destinées à être administrées à un sujet ou à une population de sujets afin de déclencher une réponse immunitaire protectrice ou palliative contre la dengue (c'est-à-dire, des compositions vaccinales ou des vaccins). La réponse immunogénique peut être une réponse immuno-protectrice déclenchée chez un sujet humain.

Le terme « inactivé » dans le contexte d'un vaccin à virus de la dengue signifie que le composant antigénique (par exemple, un virus) est incapable de se répliquer *in vivo* ou *in vitro*. Par exemple, le terme inactivé englobe un virus qui a été répliqué, par exemple *in vitro*, et ensuite tué en utilisant un moyen chimique ou physique de manière à ce qu'il ne soit plus du tout capable de se répliquer. Le terme peut également comprendre les antigènes produits par d'autres

traitements (par exemple, par fractionnement, fragmentation, et équivalents), et les composants produits par des moyens de recombinaison, par exemple dans une culture cellulaire.

5 Tel qu'utilisé dans le présent document, un « mélange » comprend au moins deux éléments différents, par exemple un mélange comprenant les molécules d'une espèce polypeptidique et les molécules d'une espèce adjuvante, ou comprenant les molécules de deux
10 polypeptides différents.

Tels qu'utilisés dans le présent document, les termes « peptide », « polypeptide » et « protéine » sont interchangeable et font référence à un polymère d'acides aminés, quelle que soit la taille. Bien que
15 « protéine » soit souvent utilisée en référence à des polypeptides relativement grands, et que « peptide » soit souvent utilisé en référence à des petits polypeptides, l'usage de ces termes dans l'art se chevauche et varie. Le terme « polypeptide », tel
20 qu'utilisé dans le présent document, fait référence aux peptides, aux polypeptides et aux protéines, sauf indication contraire. Tels qu'utilisés dans le présent document, les termes « protéine », « polypeptide » et
25 « peptide » font référence à la fois aux produits génétiques exprimés et aux entités synthétisées par voie chimique, et englobent les glycoprotéines et les toxines protéiques inactivées (anatoxines).

Tel qu'utilisé dans le présent document, le terme « purification » (par exemple, par rapport à un
30 pathogène ou à une composition contenant un pathogène, tel qu'un virus de la dengue) fait référence au procédé

d'élimination des composants indésirables d'une composition. Le terme purification est un terme relatif, et ne nécessite pas que la totalité des traces du composant indésirable soit éliminée de la composition
5 (ne nécessite pas une pureté absolue). Dans le contexte de la production d'un vaccin, une purification peut comprendre des procédés tels que la centrifugation, la dialyse, la chromatographie par échange d'ions et la chromatographie d'exclusion stérique, la purification
10 par affinité ou la précipitation. Par conséquent, par exemple, une préparation de virus purifié est une préparation dans laquelle le virus est davantage enrichi qu'il ne l'est dans son environnement génératif, par exemple au sein d'une cellule ou d'une population de
15 cellules dans laquelle il se réplique naturellement ou dans un environnement artificiel, tel qu'une culture. Une préparation de virus sensiblement purs peut être purifiée de façon que le virus ou composant viral souhaité représente au moins 50 % de la teneur totale en
20 protéines de la préparation. Dans certains modes de réalisation, un virus sensiblement pur représentera au moins 60 % ou au moins 70 %, comme au moins 80 %, au moins 85 %, au moins 90 % ou au moins 95 % ou plus de la teneur totale en protéines de la préparation. En variante,
25 la purification d'une préparation de virus peut être évaluée par la réduction des contaminants, tels que les protéines de la cellule hôte, dans la préparation. Par conséquent, une préparation de virus sensiblement pur (par exemple, un virus de la dengue inactivé et purifié)
30 comprend généralement moins de 30 %, ou au moins de 25 %, de protéines résiduelles de la cellule hôte. Par exemple,

une composition immunogène (par exemple, une préparation en vrac ou une formulation vaccinale finie) comprenant un virus de la dengue inactivé et purifié peut comprendre moins de 20 % de protéines résiduelles de la cellule hôte, moins de 15 %, ou 10 % ou moins (par exemple, mesuré sur une base en poids/poids).

Tel qu'utilisé dans le présent document, un « sujet » est un organisme vertébré multicellulaire vivant. Dans le contexte de la présente divulgation, le sujet peut être un sujet expérimental, comme un animal non humain, par exemple un mammifère tel qu'une souris, un rat du coton ou un primate non humain. En variante, le sujet peut être un sujet humain, par exemple dans un environnement clinique.

Tel qu'utilisé dans le présent document, un « tensioactif » ou un agent à activité en surface, est une molécule amphiphile caractérisée par une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Quand il est adsorbé à la surface d'un liquide, un tensioactif agit pour diminuer la tension de surface du liquide, la tension interfaciale entre deux liquides, ou la tension entre le liquide et un solide. Un tensioactif peut jouer le rôle de détergent, d'agent mouillant, d'émulsifiant, d'agent moussant et/ou de dispersant.

Tel qu'utilisé dans le présent document, le terme « comprend » signifie « inclut ». Par conséquent, sauf si le contexte ne l'exige autrement, on comprendra que le mot « comprend » et les variations telles que « comprendre » et « comprenant » impliquent l'inclusion d'un composé indiqué ou d'une composition indiquée (par exemple, un antigène ou un excipient) ou une étape

indiquée, ou un groupe de composés ou d'étapes, mais pas l'exclusion d'un quelconque autre composé, composition, étape ou groupe de ceux-ci. Quand il est décrit que des modes de réalisation comprennent certains composants, ces modes de réalisation sont destinés à inclure les modes de réalisation constitués des composants indiqués.

Les exemples suivants sont fournis pour illustrer des caractéristiques et/ou des modes de réalisation. Il ne doit pas être considéré que ces exemples limitent l'invention aux caractéristiques ou modes de réalisation particuliers décrits. Il sera compris par l'homme du métier que les quantités, par exemple les volumes, sont seulement fournies à titre d'exemple, et que l'échelle peut être modifiée (augmentée ou diminuée) au choix du médecin traitant. De manière similaire, les composants utilisés dans les dosages, par exemple les filtres, les colonnes, ne sont pas destinés à limiter ou à exclure d'une quelconque manière que ce soit, et peuvent être remplacés par d'autres composants pour atteindre le même objectif, comme le comprendra l'homme du métier.

Exemples

Exemple 1 : préparation d'un PIV de la dengue (DEN)

Les virus de la dengue inactivés et purifiés de sérotypes DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4 ont été préparés comme précédemment décrit ; voir Simmons *et al.*, *Virology* 396 : 280-288 (2010) et Fernandez *et al.*, *Clin. Vaccine Immunol.* 18(4) : 523-32 (2011). En bref, les virus ont été propagés dans une lignée de cellules Vero, et le virus

dans le surnageant de culture a été concentré, purifié et inactivé avec du formol.

Exemple 2 : procédés de dosage

5

ELISA : des anticorps monoclonaux (mAb) spécifiques des sérotypes DENV ont été identifiés et confirmés pour les sérotypes DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4 (respectivement, les mAb E103, DV44, DV3/1I et E88). Un protocole de dosage immuno-enzymatique (ELISA) sur DENV a été établi en utilisant le mAb approprié spécifique de DENV et une détection avec le même mAb conjugué à la biotine. Ce test ELISA a été utilisé pour déterminer l'antigénicité *in vitro* spécifique du sérotype.

15

Un test ELISA d'antigénicité basé sur l'inhibition a été développé pour évaluer la teneur en antigène des formulations dans lesquelles les antigènes étaient adsorbés sur de l'aluminium. En bref, des antigènes DPIV adsorbés sur de l'alun sont initialement mis en incubation avec les mAb conjugués à la biotine et spécifiques des sérotypes DENV décrits ci-dessus. Les mélanges d'antigènes/mAb sont ensuite centrifugés avant de transférer le surnageant sur des plaques ELISA préalablement revêtues avec une substance purifiée de DENV en vrac (PB). La liaison des mAb est révélée par l'ajout du substrat streptavidine Amdex-HRP (Amersham) et de TMB (tétra-méthyl-benzidine peroxydase).

20

25

Diffusion dynamique de la lumière (DLS) : un lecteur de plaque Wyatt DynaPro (Wyatt Technology Corp) a été utilisé pour déterminer le profil de distribution

30

des tailles des petites particules en suspension. Le protocole à utiliser de multiples plaques de 96 puits, fond transparent aux UV (Corning, NY), température de 22 °C, puissance du laser 14 %, atténuation 77 %, temps d'acquisition 5 secondes. Cinq mesures ont été obtenues par échantillon.

Les résultats de l'analyse DLS sont exprimés par la moyenne Z, qui est obtenue par l'analyse des données DLS en utilisant la technique des cumulants (voir, par exemple, Koppel, J. Chem. Phys 57 : 4814-4820 (1972) ; Thomas, J. Colloid Interface Sci. 117 : 187-192 (1987)). La taille moyenne Z augmente quand la taille des particules augmente, et fournit donc une mesure fiable de la taille moyenne d'une distribution de taille de particule.

Chromatographie d'exclusion stérique à haute performance (détection UV) : des conditions de chromatographie d'exclusion stérique en phase liquide pour déterminer la teneur en protéines par détection UV ont été développées. Le système de chromatographie en phase liquide était une CLHP Waters Alliance e2695, UV 2998 ; colonne TSKGel G600 PWXL, DI de 7,8 mm X L de 30 cm ; température du dispositif chauffant 40 °C ; volume d'injection 100 µl ; température de l'échantillon 15 °C ; durée de l'analyse 25 minutes ; phase mobile : TRIS 5 mM, NaCl 150 mM, PX188 0,1 %, pH 7,4 ; longueur d'onde UV 210 nm ; débit 1,0 ml/minute.

Néphélométrie : la néphélométrie évalue le trouble, ou la turbidité, d'une solution dû à la présence des

particules en suspension. Les exemples fournis dans le présent document ont utilisé un néphélomètre à microplaque Nephelostar (BMG Labtech) et de multiples plaques de 96 puits (fond transparent aux UV, Corning, NY). Le volume de l'échantillon était de 100 µl. L'instrument Nephelostar comprenait un système optique dédié pour mesurer la diffusion de la lumière provoquée par la turbidité. Réglages optiques : gain 55 ; intensité du laser (%) 90 ; focalisation du faisceau (mm) 1,5. Réglages généraux : délai de positionnement (seconde) 0,1 ; lecture direction horizontale.

L'unité néphélométrique (UN) est une unité sans dimension. UTN signifie unité néphélométrique de turbidité, 10 UTN (par exemple, comme indiquée sur les figures 9 et 10) correspondant à la limite de détection par l'œil et étant déterminés pour chaque expérience avec un témoin interne comprenant la molécule de formazine diluée jusqu'à une concentration spécifique (10 UTN \approx 500 UN avec l'instrumentation de laboratoire décrite dans le présent document). Une augmentation de la néphélométrie indique une augmentation de la turbidité d'une solution qui peut être attribuée, dans les présents exemples, à un phénomène d'agrégation.

Diffusion statique de la lumière : l'essai de diffusion statique de la lumière pour évaluer la taille des particules a utilisé l'instrument Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Ltd.). Le dispersant était du NaCl 150 mM plus Tris 5 mM ; la température était de 20-25 °C, l'obscurcissement était d'environ 5 à 7 %, la vitesse de recirculation de

1250 tours/minute, l'étalon de taille était des microsphères de polymère de latex de 5 µm. Les diluants pour échantillon ont été utilisés pour la mesure du fond. Cinq mesures ont été utilisées pour calculer les distributions de tailles moyennes et les valeurs rapportées.

Fluorescence intrinsèque : l'évaluation de la teneur en protéines par fluorescence intrinsèque (IF) a été réalisée avec un système Varioskan Flash (Thermo Scientific) en utilisant de multiples plaques de 96 puits à fond transparent aux UV (Corning) contenant 100 µl d'échantillon. La fluorescence intrinsèque des protéines est provoquée par l'excitation des protéines avec une lumière ultraviolette à 280 nm et l'observation s'effectue à environ 320 nm. Pour la détermination de la concentration et pour réduire les interférences et la variabilité, une courbe d'étalonnage a été établie avec chaque sérotype de la dengue, et chaque échantillon a été introduit dans trois puits.

Exemple 3 : substance médicamenteuse PIV DEN4

Une composition comprenant un PIV DEN4 a été formulée et combinée avec un tampon (50 mM de NaCl, 5 mM de Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane), 3 % en poids/volume de saccharose et 0,1 % en poids/volume de poloxamère 188. Le pH final était de 8,0 et la teneur finale en virus DEN4 était de 34 µg/ml. Dans le cadre de cet exemple, cette formulation de base a été utilisée comme témoin. La stabilité du PIV DEN4 dans cette formulation de base s'est avérée être limitée, avec une

augmentation de la taille des particules virales et une chute de l'antigénicité se produisant après 48 heures à température ambiante (25 °C).

5 Exemple 4 : criblage des excipients avec la substance
médicamenteuse PIV DEN4

Divers excipients à tester (tableaux 1 et 2) ont été ajoutés à la formulation de base contenant PIV DEN4 (comme décrit ci-dessus) pour déterminer si le sérotype
10 DEN4 pouvait être stabilisé. Les excipients testés étaient des sucres, des acides aminés, des ions bivalents, des tensioactifs et des co-solvants. La formulation de base contenant PIV DEN4 (avant l'ajout des excipients testés) contenait 3 % de saccharose ; quand le
15 saccharose a été utilisé comme excipients à tester, il était présent en plus des 3 % de saccharose de la formulation de base. La formulation de base contenant PIV DEN4 contenait également 0,1 % de poloxamère 188 ; quand le poloxamère 188 a été utilisé comme excipient à
20 tester, il était présent en plus des poloxamère 188 à 0,1 % de la formulation de base.

La stabilité a été évaluée après un stockage de 48 heures à 25 °C, en utilisant la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et une HP-SEC-UV (chromatographie
25 d'exclusion stérique à haute performance utilisant la détection par ultraviolet). Le témoin (« CTRL PB ») pour les figures 3 et 6 était une courbe d'étalonnage préparé avec une substance DEN4 purifiée en vrac fraîchement décongelée et diluée.

30 Résultats : les figures 1 à 3 présentent les résultats pour la formulation de substance

médicamenteuse à base de PIV DEN4 complétée avec les excipients à tester énumérés dans le tableau 1. La figure 1 fournit les résultats DLS au temps 0, la figure 2 fournit les résultats DLS après 48 heures de stockage à 25 °C, et la figure 3 fournit les résultats de la récupération par HP-SEC-UV après 48 heures de stockage à 25 °C. Les témoins étaient la formulation de base contenant PIV DEN4 sans excipient à tester (indiquée par substance purifiée en vrac (« PB ») sur les figures).

10 Les figures 4 à 6 présentent les résultats pour les excipients à tester énumérés dans le tableau 2. La figure 4 fournit les résultats DLS au temps 0, la figure 5 fournit les résultats DLS après 48 heures de stockage à 25 °C, et la figure 6 fournit les résultats de la
15 récupération par HP-SEC-UV après 48 heures de stockage à 25 °C. Les témoins étaient la formulation de base contenant PIV DEN4 (sans excipient à tester).

Tableau 1 : excipients testés

Excipient		
Alanine	34 mM	Thréonine
Alanine	341 mM	Taurine
Phénylalanine	3,4 mM	Taurine
Phénylalanine	34,1 mM	Valine
Leucine	3 mM	Valine
Leucine	30 mM	Sérine
Acide glutamique	1 mM	Sérine
Acide glutamique	10 mM	Proline
Acide aspartique	1,14 mM	Proline
Acide aspartique	11,4 mM	Arginine
Lysine	1 mM	Arginine
Lysine	10 mM	Glycine
Thréonine	10 mM	Glycine
		Asparagine
		Asparagine

	30 mM
	11,4 mM
	114 mM
	11,4 mM
	114 mM
	11,4 mM
	114 mM
	34 mM
	341 mM
	30 mM
	300 mM
	30 mM
	300 mM
	3,41 mM
	34,1 mM

Histidine	30 mM
Histidine	30 mM
Méthionine	30 mM
Méthionine	30 mM
CaCl ₂ & Arginine	15 mM & 30 mM
CaCl ₂ & Arginine	15 mM & 300 mM
CaCl ₂ & Histidine	15 mM & 30 mM
CaCl ₂ & Histidine	15 mM & 30 mM
MgSO ₄ & Arginine	15 mM & 30 mM
MgSO ₄ & Arginine	15 mM & 30 mM
MgSO ₄ & Histidine	15 mM & 30 mM
MgSO ₄ & Histidine	15 mM & 300 mM
ZnCl ₂	15 mM
ZnCl ₂	15 mM
ZnCl ₂ & Arginine	15 mM & 30 mM

ZnCl ₂ & Arginine	15 mM & 300 mM
ZnCl ₂ & Histidine	15 mM & 30 mM
ZnCl ₂ & Histidine	15 mM & 30 mM
CaCl ₂	15 mM
CaCl ₂	15 mM
MgSO ₄	15 mM
MgSO ₄	15 mM
TRAVASOL(TM)	1,5 %
TRAVASOL(TM)	3,0 %
TRAVASOL(TM)	5,0 %
CTRL DEN4 PB	-
CTRL DEN4 PB	-
CTRL DEN4 PB	-

* Le TRAVASOL(TM) (Baxter Corporation) est une solution pharmaceutique stérile contenant 10 % d'acides aminés.

Tableau 2 : excipients testés

Excipient	Conc.		
Maltose	5,7 %	PEG3350	3 %
Maltose	11,4 %	PEG3350	5 %
Glucose	5,7 %	PEG3350	10 %
Glucose	11,4 %	PEG6000	3 %
Dextrane	5,7 %	PEG6000	5 %
Dextrane	11,4 %	PEG6000	10 %
Tréhalose	3 %	Polox188	0,05 %
Tréhalose	5 %	Polox188	0,1 %
Tréhalose	10 %	Polox188	0,24 %
Mannitol	3 %	Saccharose	1,5 %
Mannitol	5 %	Saccharose	3 %
Mannitol	10 %	Saccharose	5 %
Glycérol	3 %	Saccharose	10 %
Glycérol	5 %	VES	1 mM
Glycérol	10 %	VES	1 mM
HP-b-CD	3 %	CaCl ₂	15 mM
		CaCl ₂	15 mM

HP-b-CD	5 %
HP-b-CD	10 %
PEG300	3 %
PEG300	5 %
PEG300	10 %

MgSO ₄	15 mM
MgSO ₄	15 mM
CTRL DEN4 PB	-
CTRL DEN4 PB	-
CTRL DEN4 PB	-

Parmi les excipients testés initiaux évalués (tableaux 1 et 2), la plupart ont été éliminés sur la base des résultats des analyses DLS et HP-SEC-UV après 48 heures à 25 °C ; dix excipients à tester ont été sélectionnés pour poursuivre l'étude.

Exemple 5 : tests supplémentaires des excipients à tester sélectionnés avec la substance médicamenteuse PIV DEN4

10 Sur la base des résultats des exemples ci-dessus, dix excipients à tester ont été sélectionnés pour d'autres tests, certains étant évalués à plus d'une concentration (tableau 3).

15 Tableau 3 : excipients à tester

Excipient	
Maltose	11,4 %
Dextrane	5,7 %
Saccharose	1,5 %
Saccharose	4,0 %
Saccharose	8,0 %
Glycérol	3 %
Glycérol	10 %
PEG300	3 %
PEG300	5 %
Histidine	30 mM
Méthionine	30 mM
Asparagine	3,41 mM
CaCl ₂	15 mM
MgSO ₄	15 mM
CTRL DEN4PB (PB)	-

Les excipients à tester ont été ajoutés à PIV DEN4 (formulation de base décrite dans l'exemple 4 ci-dessus). La stabilité a été évaluée au temps zéro, après 48 heures à 25 °C, et après 7 jours à 25 °C. Quatre échantillons ont été testés pour chaque excipient, à chaque période temporelle (n = 4). Comme témoin, la formulation de base contenant PIV DEN4 a également été évaluée à ces périodes temporelles.

Les échantillons ont été évalués par DLS, HP-SEC-UV, néphélométrie, ELISA and fluorescence intrinsèque (IF).

Les résultats sont présentés sur les figures 7 à 16, où les barres sont la moyenne de quatre échantillons testés (n =4), avec l'erreur type indiquée. ELISA : l'axe des Y est le % de récupération par rapport à l'antigénicité théorique qui aurait dû être trouvée sur la base du facteur de dilution appliqué. IF : l'axe des Y est le % de récupération par rapport à une courbe d'étalonnage préparée avec la substance médicamenteuse DEN4 fraîchement décongelée et diluée.

Les résultats démontrent que la présence de certains excipients testés (notamment le saccharose à 8 %, CaCl₂ à 15 mM et MgSO₄ à 15 mM) a réduit l'agrégation du virus après 7 jours de stockage à 25 °C (évaluée par DLS et néphélométrie), par rapport au témoin. En outre, l'antigénicité a été conservée au cours du temps (telle qu'évaluée par HP-SEC-UV, ELISA et IF).

Exemple 6 : formulation tétravalente non adjuvantée

Pour examiner davantage l'effet du CaCl_2 , du MgSO_4 , et d'une concentration élevée de saccharose sur la stabilité de PIV DEN4, des plages de dose de CaCl_2 (1,8 mM, 3,75 mM, 7,5 mM, 15 mM, 30 mM, 45 mM) et de MgSO_4 (1,8 mM, 3,75 mM, 7,5 mM, 15 mM, 30 mM, 45 mM), ainsi que du saccharose à 8 % en poids/volume, ont été ajoutés à la composition tétravalente de base non adjuvantée de virus de la dengue. La formulation tétravalente de base contenait 8 µg/ml de chacun parmi DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4, avec 150 mM de NaCl, 5 mM de Tris, 2 % en poids/volume de saccharose, 0,1 % en poids/volume de px188, pH 8,5 (formulation tétravalente de base). Le témoin (« ctrl tetra ») était la formulation tétravalente de base (sans CaCl_2 , MgSO_4 , ou saccharose supplémentaire).

La stabilité après 6 jours à 25 °C a été évaluée par DLS et ELISA. Les résultats sont présentés sur la figure 17 (diamètre (nm) évalué par DLS), et les figures 18 à 21 (antigénicité de DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4, respectivement, évaluée par ELISA). Les barres présentées sur les figures 17 à 21 sont la moyenne de quatre échantillons (n = 4), avec l'erreur type indiquée.

25 Exemple 7

Sur la base des expériences précédentes, trois conditions d'excipient (saccharose total à 8 %, MgSO_4 à 15 mM et CaCl_2 à 15 mM) ont été sélectionnées pour une comparaison côte à côte dans la formulation tétravalente de PIV DEN non adjuvantée (comme décrite ci-dessus). Dans cet exemple, le groupe témoin est une formulation

tétravalente avec 2 % de saccharose total, ce qui est la quantité résiduelle de saccharose provenant de la substance médicamenteuse.

Le témoin (2 % de saccharose) et les formulations testées ont été mis en incubation pendant 7 jours à 4 °C, 25 °C et 37 °C. Les lectures ont ensuite été appliquées aux échantillons non centrifugés (NC) et aux échantillons centrifugés (C) pour évaluer la perte de teneur si une agrégation était présente.

Les figures 22 à 25 représentent des graphiques de l'antigénicité des sérotypes DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4, respectivement, provenant de la formulation tétravalente non adjuvantée, évaluée par ELISA. « NC » indique l'échantillon non centrifugé et « C » indique l'échantillon centrifugé. La figure 26 est un graphique des résultats issus de l'analyse DLS, montrant une augmentation de la taille moyenne des particules dans la formulation maintenue à différentes températures. « Fraîche » indique la formulation de base évaluée à T0.

La figure 27 représente un graphique de la teneur en protéines déterminée par SEC CLHP avec détection UV, et fournit les résultats sous la forme du % de récupération par rapport à la teneur en protéines du produit purifié en vrac. Comme une centrifugation avant l'analyse aurait éliminé les agrégats, seuls les échantillons non centrifugés ont été évalués. La figure 28 représente un graphique des résultats de l'évaluation par néphélométrie.

Exemple 8 : formulation adjuvantée

Les excipients testés sélectionnés ont été évalués en utilisant une formulation tétravalente adjuvantée avec $\text{Al}(\text{OH})_3$ contenant 4 μg de chacun des quatre sérotypes DENV, et 500 μg d'adjuvant $\text{Al}(\text{OH})_3$. La formulation comprenait 150 mM de NaCl, 5 mM de Tris, 2 % en poids/volume de saccharose, 0,1 % en poids/volume de px188, pH 8,5 (formulation tétravalente de base). Cet exemple a utilisé des échantillons d'environ 20 ml (plutôt que des microplaques à puits). Les excipients testés étaient 15 mM de CaCl_2 , 15 mM de MgSO_4 et du saccharose à une teneur totale de 8 % en poids/volume. Le témoin contenait 2 % en poids/volume de saccharose provenant de la substance médicamenteuse. Les échantillons ont été évalués après 7 jours à 4 °C, après 7 jours à 25 °C, et après 7 jours à 37 °C.

La figure 29 présente les résultats de la diffusion statique de la lumière (SLS) pour mesurer les particules < 10 μm , et la figure 30 présente la SLS pour mesurer les particules < 100 μm .

Exemple 9 : agrégation réduite après 7 jours à 30 °C, avec le MgSO_4 comme excipient

La stabilité de la DS PIV DEN4 complétée avec 15 mM de MgSO_4 a été évaluée par DLS au temps zéro (T0), après une semaine (1W, 7 jours) de stockage à 22 °C, après 1W de stockage à 30 °C, après un cycle de congélation/décongélation (1F/T), après deux cycles de congélation/décongélation (2F/T) et après trois cycles de congélation/décongélation (3F/T). Voir la figure 31.

La comparaison a été réalisée à par rapport au témoin (CTRL, DS DEN4 DS sans $MgSO_4$).

Le $MgSO_4$ à 15 mM a stabilisé la taille du virus DEN4 après un stockage d'une semaine à 30 °C par rapport à 5 une composition sans $MgSO_4$ (comparer la cinquième et la sixième barre sur la figure 31). L'axe des Y est la taille moyenne Z (diamètre) des particules virales en nanomètres.

REVENDICATIONS

1. Composition immunogène, comprenant :

(a) un virus de la dengue de sérotype 4 inactivé et purifié ;

(b) un agent tampon ;

5 (c) un tensioactif ; et

(d) un excipient améliorant la stabilité.

2. Composition immunogène selon la revendication 1, dans laquelle ledit excipient améliorant la stabilité est choisi parmi un sel inorganique et un sucre.

10 3. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit excipient améliorant la stabilité est choisi parmi CaCl_2 , MgSO_4 et le saccharose.

15 4. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit excipient améliorant la stabilité est choisi parmi MgSO_4 à une concentration d'au moins ou d'environ 1,8 mM, d'au moins ou d'environ 3,75 mM, d'au moins ou d'environ 7,5 mM, d'au moins ou d'environ 15 mM, d'au moins ou d'environ 30 mM, et d'au moins ou d'environ 45 mM.

20 5. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle ledit excipient améliorant la stabilité est choisi parmi CaCl_2 à une concentration d'au moins ou d'environ 1,8 mM, d'au moins ou d'environ 3,75 mM, d'au moins ou d'environ 7,5 mM, d'au moins ou d'environ 15 mM, d'au moins ou d'environ 30 mM, et d'au moins ou d'environ 45 mM.

6. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle ledit excipient

améliorant la stabilité est le saccharose à une concentration d'au moins ou d'environ 8 % en poids/volume (p/v), ou d'au moins ou d'environ 10 % en p/v.

5 7. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ladite composition est liquide.

 8. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre un
10 adjuvant.

 9. Composition immunogène selon la revendication 8, dans laquelle ledit adjuvant est un sel d'aluminium.

 10. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 8 à 9, dans laquelle ledit adjuvant
15 comprend au moins l'un parmi l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium.

 11. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, comprenant en outre au moins un composant immunostimulant supplémentaire.

20 12. Composition immunogène selon la revendication 11, dans laquelle l'au moins un composant immunostimulant supplémentaire comprend un(e) ou plusieurs émulsion d'huile et d'eau, liposome, lipopolysaccharide, saponine et oligonucléotide.

25 13. Composition immunogène selon la revendication 8, dans laquelle ledit adjuvant est un adjuvant sans aluminium.

 14. Composition immunogène selon la revendication 13, dans laquelle l'adjuvant sans aluminium est choisi
30 parmi une émulsion huile dans eau, un liposome, un lipopolysaccharide, une saponine et un oligonucléotide.

15. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre au moins un sérotype du virus de la dengue inactivé et purifié supplémentaire.

5 16. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre un virus de la dengue de sérotype 1 inactivé et purifié (PIV DEN1), un virus de la dengue de sérotype 2 inactivé et purifié (PIV DEN2) et un virus de la dengue de
10 sérotype 3 inactivé et purifié (PIV DEN3).

17. Composition immunogène selon la revendication 16, dans laquelle la composition déclenche une réponse immunitaire dirigée contre chacun parmi DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4 chez un humain adulte.

15 18. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le tensioactif est un poloxamère.

19. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le
20 tensioactif est présent en une quantité d'au moins 0,001 M (poids/volume).

20. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le
25 tensioactif est présent en une quantité d'au plus 1,0 % (poids/volume).

21. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant un agent tampon phosphate.

22. Composition immunogène selon la revendication
30 21, comprenant un agent tampon phosphate choisi parmi le phosphate de sodium et le phosphate de potassium.

23. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, dans laquelle l'agent tampon comprend du tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

24. Composition immunogène selon l'une quelconque
5 des revendications précédentes, qui est une préparation en vrac.

25. Procédé de formulation d'une préparation en vrac de virus de la dengue inactivé et purifié ou une formulation vaccinale finie de celle-ci, comprenant :

10 (a) la fourniture d'une solution comprenant de l'eau stérile, un agent tampon, un tensioactif et un excipient améliorant la stabilité ;

(b) l'ajout à la solution de (a), d'un virus de la dengue de sérotype 4 inactivé et purifié.

15 26. Procédé selon la revendication 25, dans lequel ledit excipient améliorant la stabilité est le $MgSO_4$.

27. Procédé selon l'une quelconque des revendications 25 à 26, dans lequel l'étape (b) comprend en outre l'ajout de sérotypes supplémentaires de virus
20 de la dengue inactivés et purifiés.

28. Procédé selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, dans lequel l'étape (b) comprend en outre l'ajout de virus de la dengue inactivés et purifiés de sérotype 1, de sérotype 2 et de sérotype 3.

25 29. Procédé selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, dans lequel ladite solution de l'étape (a) comprend en outre un adjuvant à base d'aluminium, tel qu' $Al(OH)_3$.

Figure 1

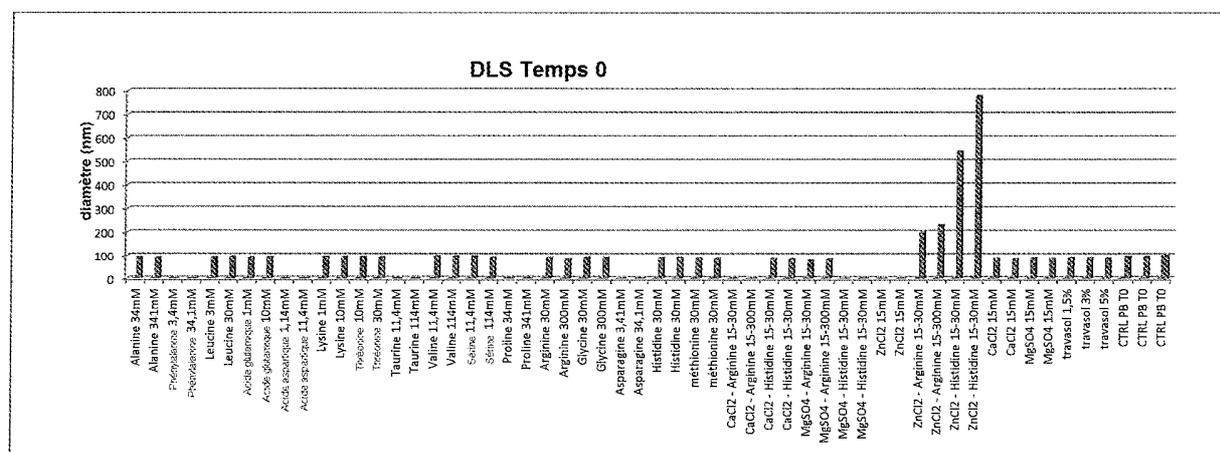


Figure 3

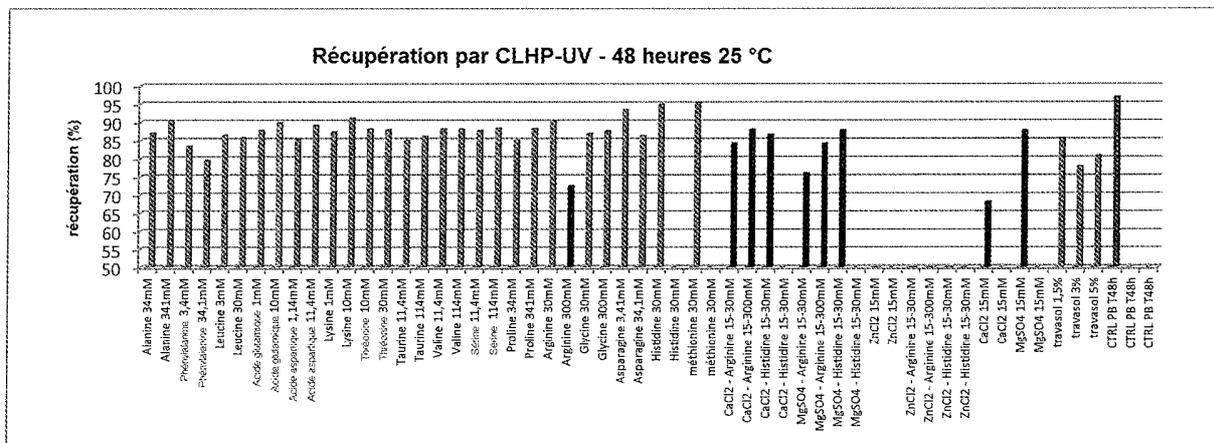


FIGURE 4

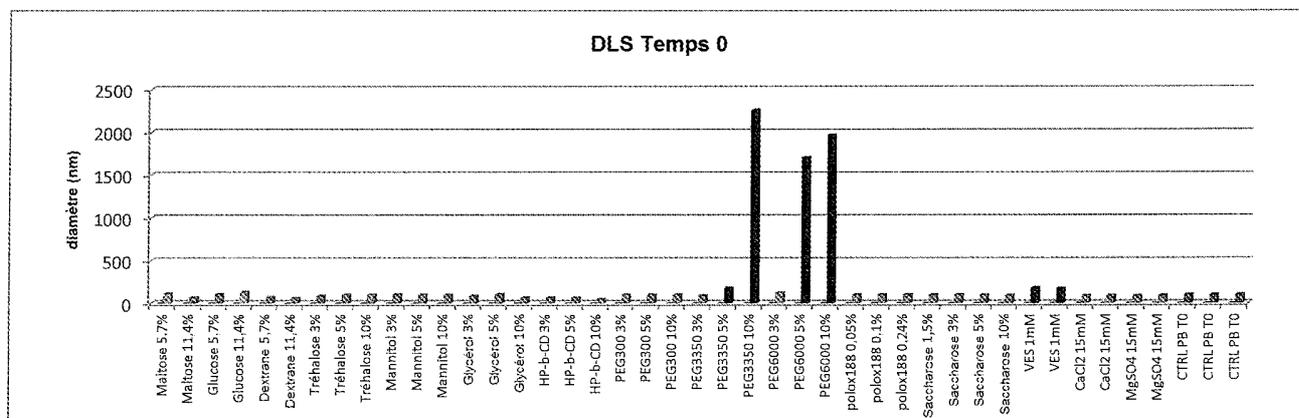


Figure 5

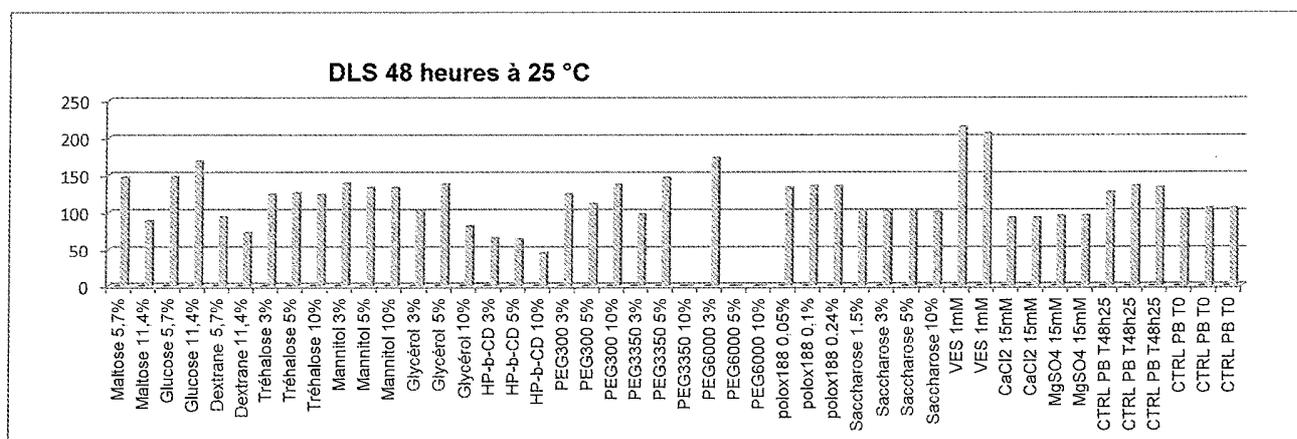


FIGURE 6

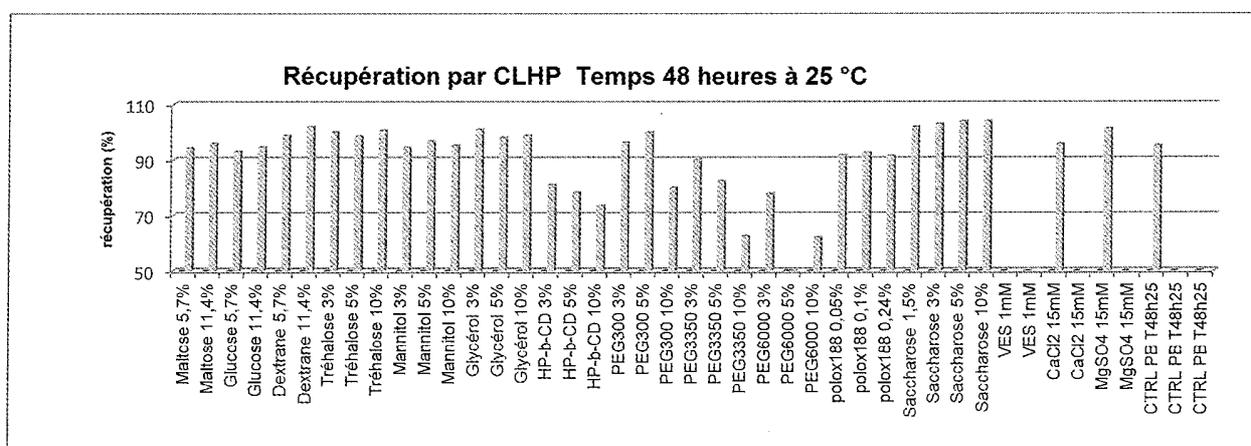


FIGURE 7

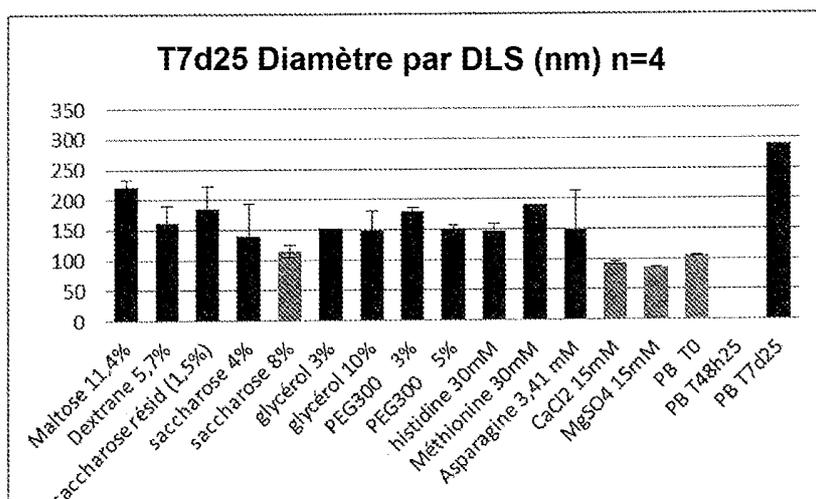
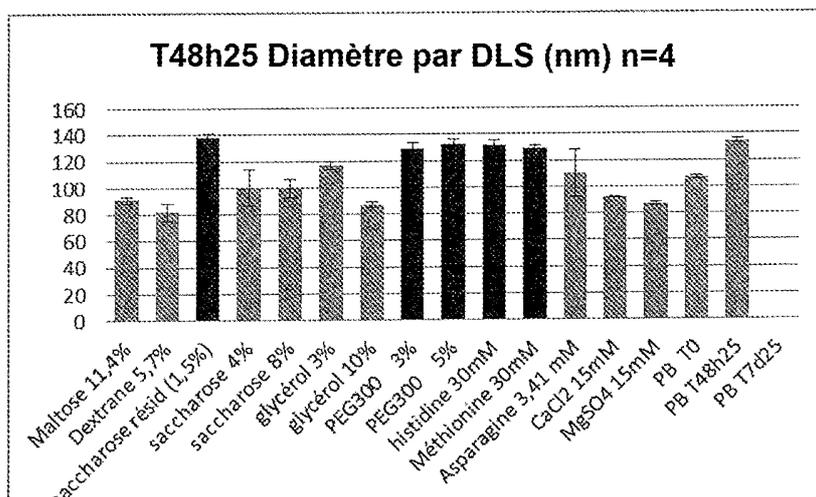


FIGURE 8

FIGURE 9

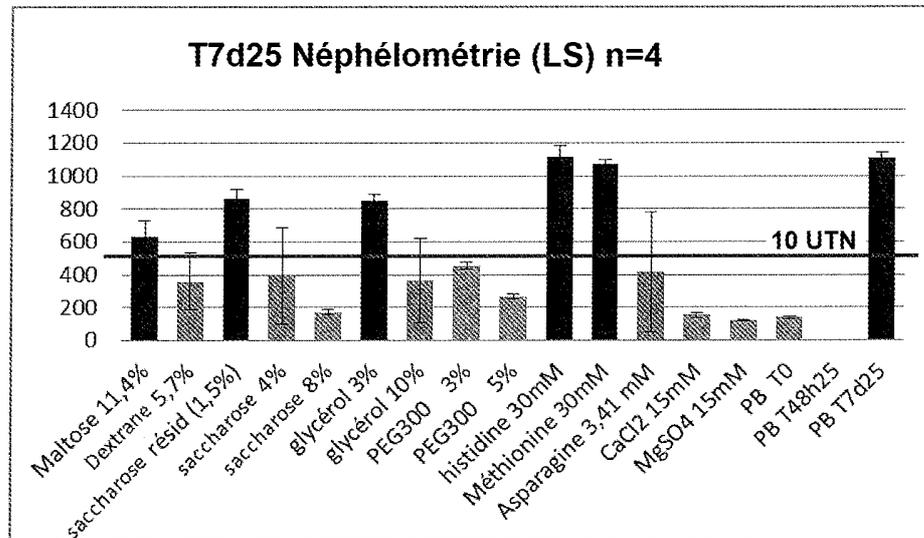
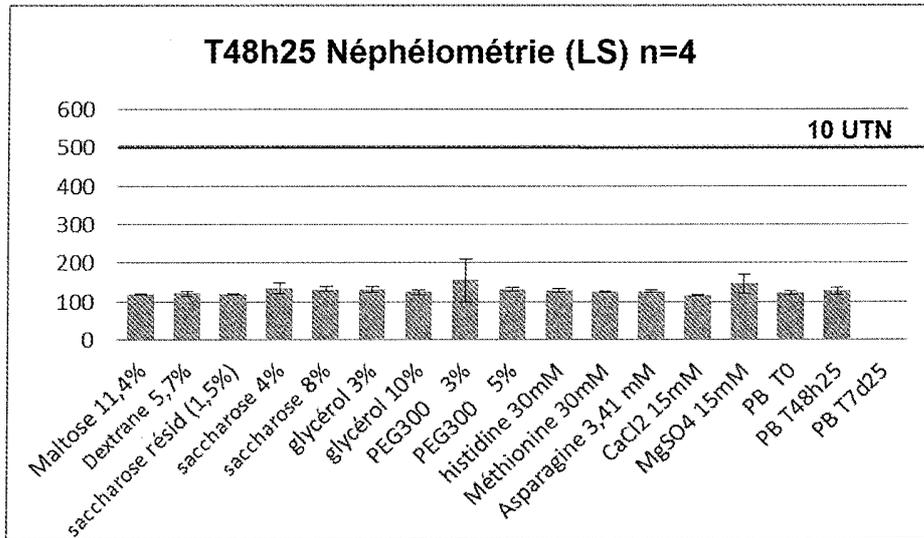


FIGURE 10

FIGURE 11

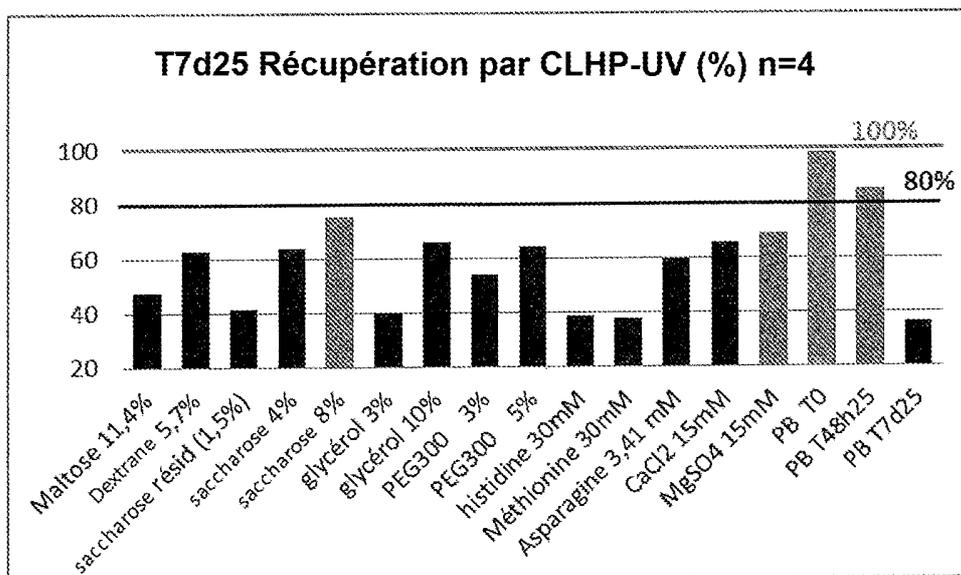
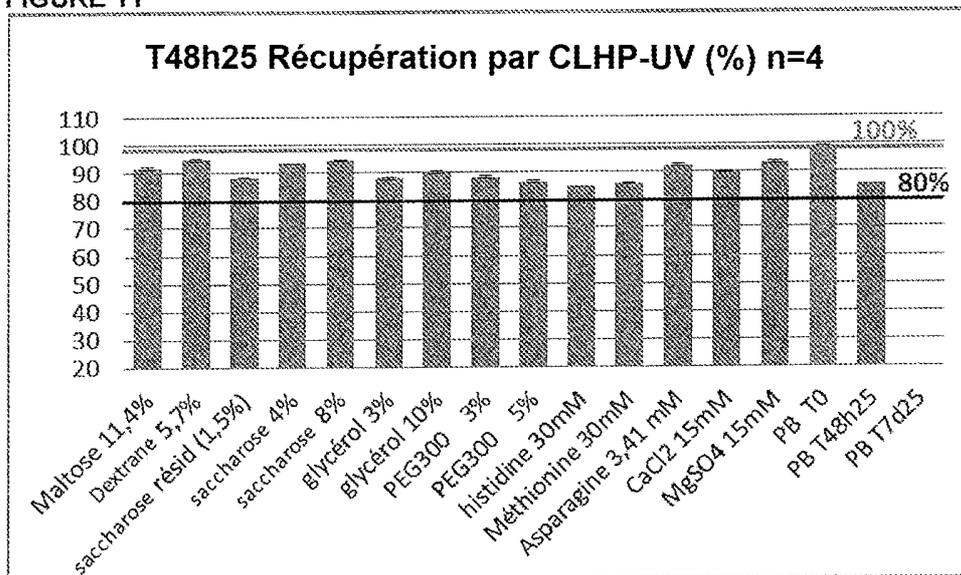


FIGURE 12

FIGURE 13

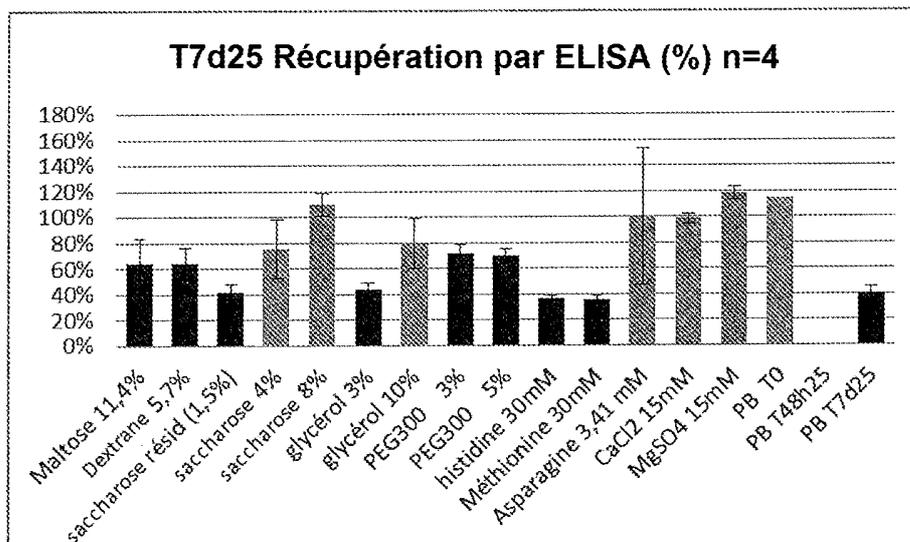
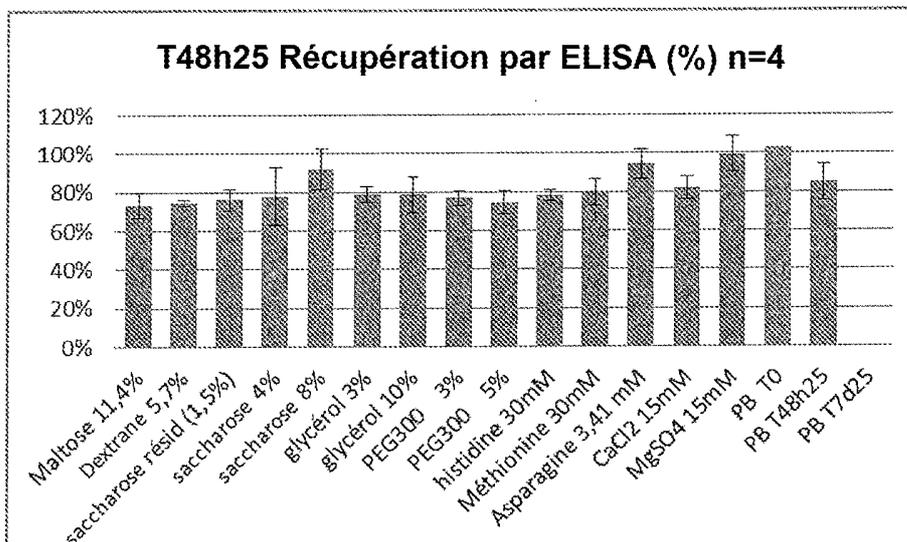


FIGURE 14

FIGURE 15

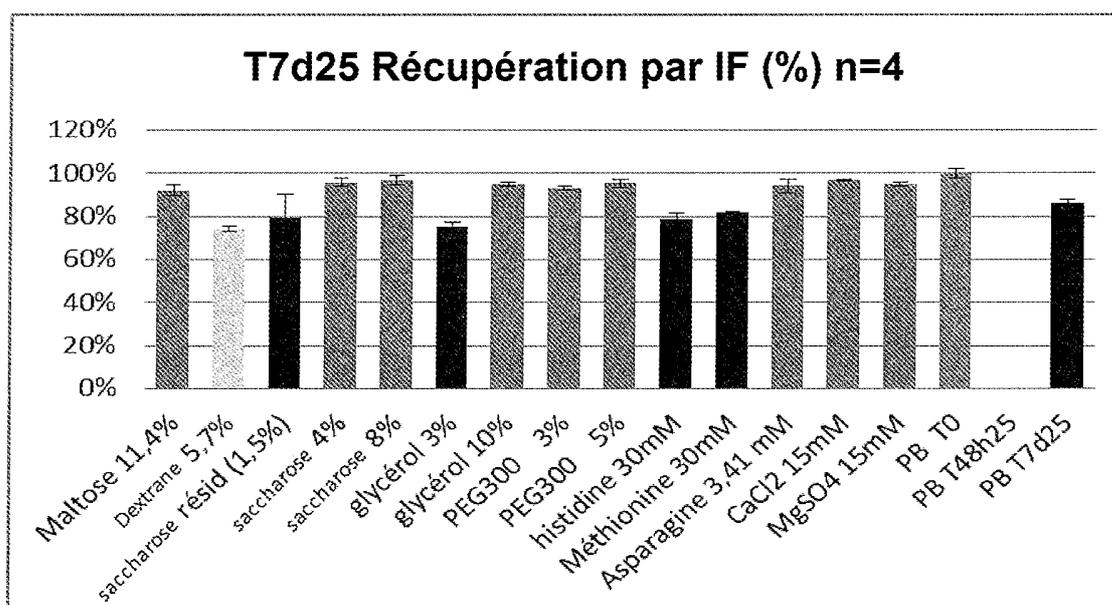
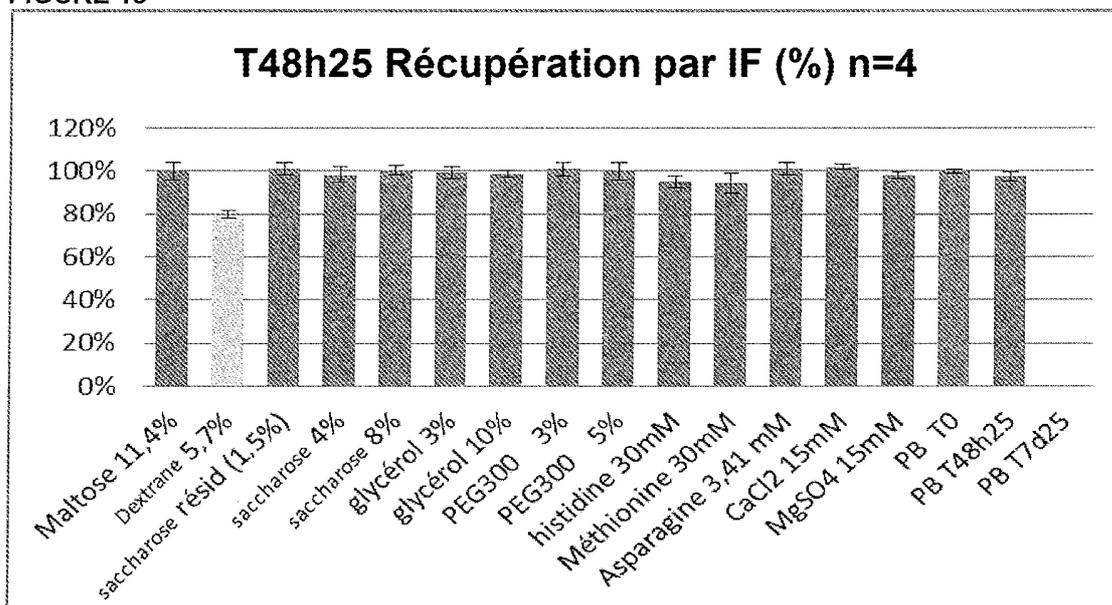


FIGURE 16

FIGURE 17

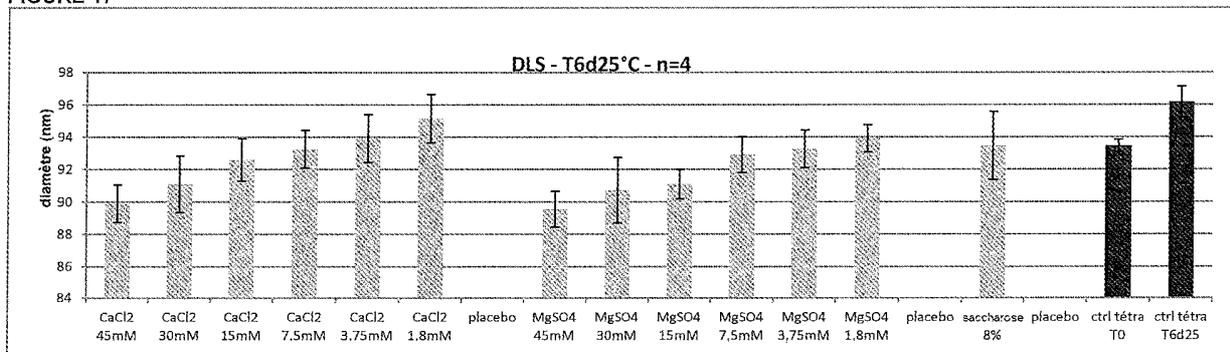


FIGURE 18

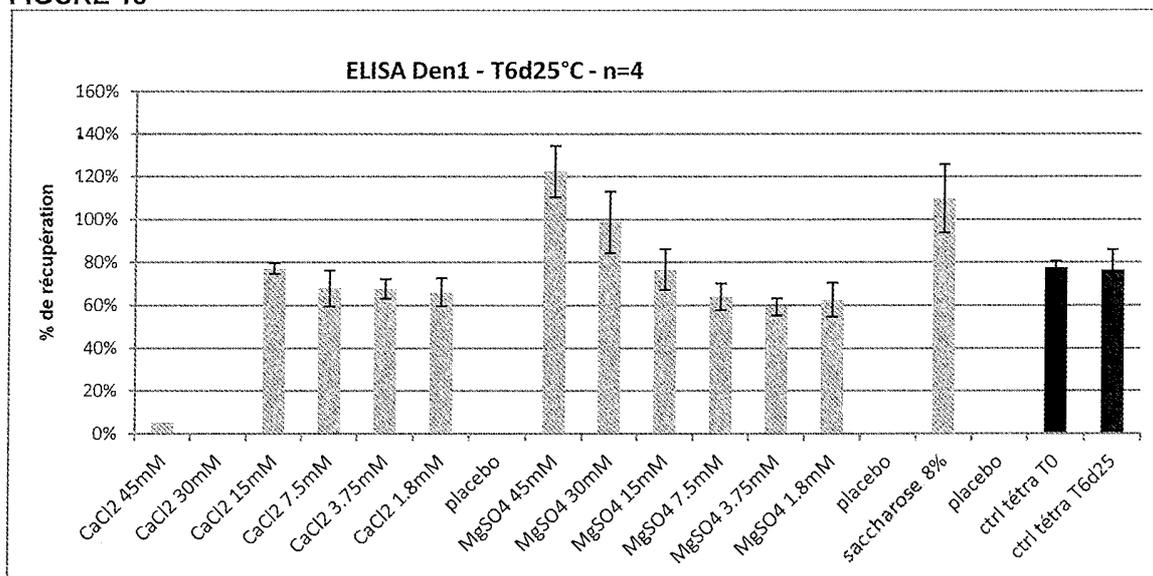


FIGURE 19

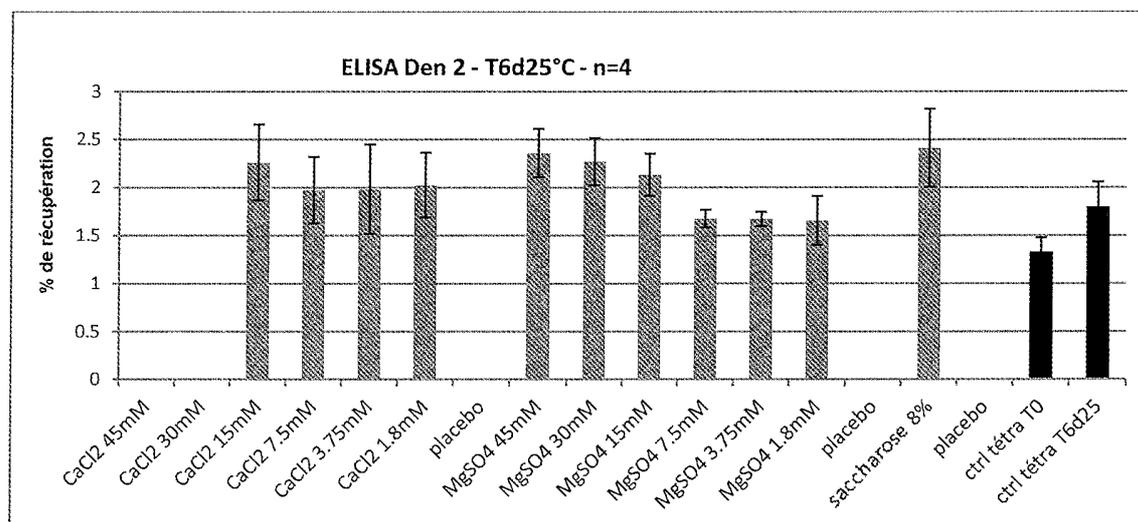


FIGURE 20

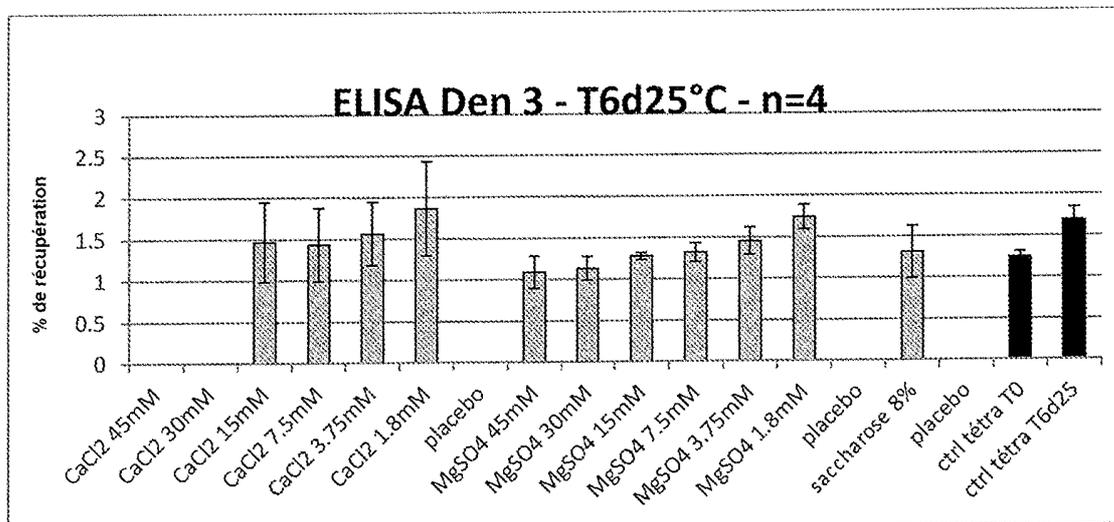


FIGURE 21

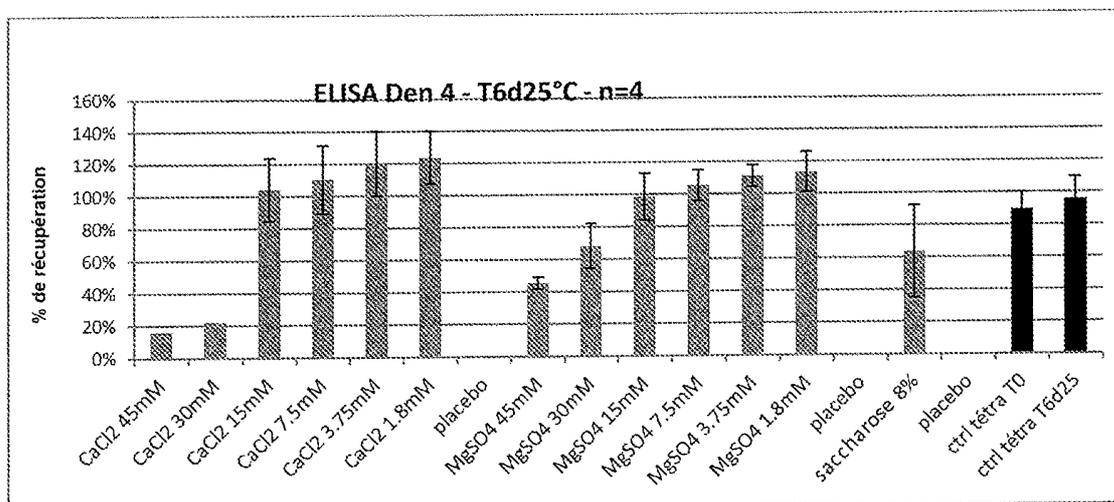


FIGURE 22

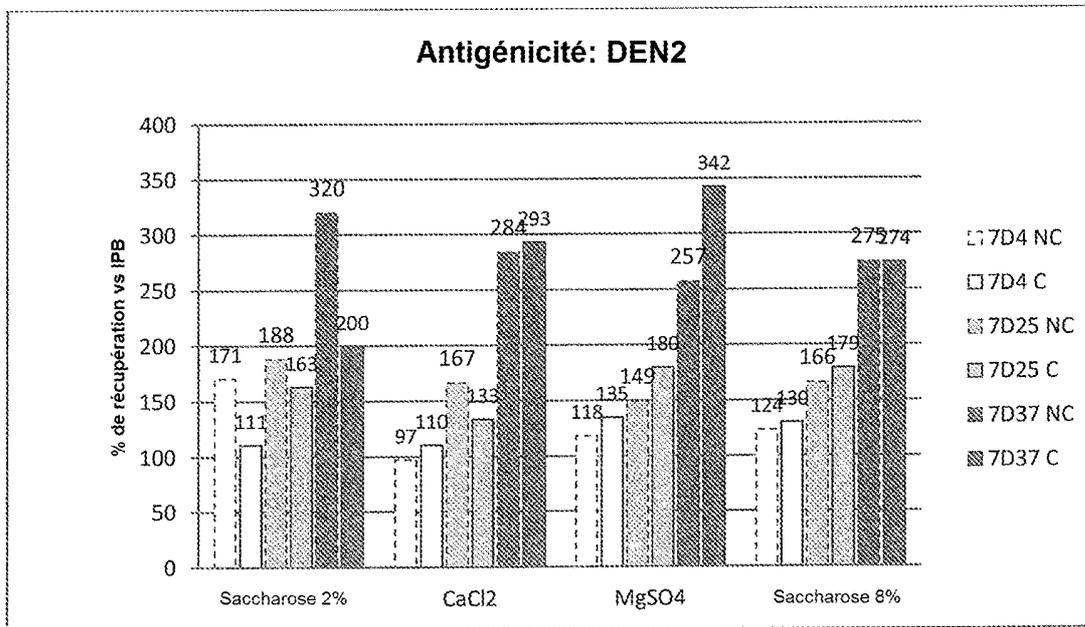
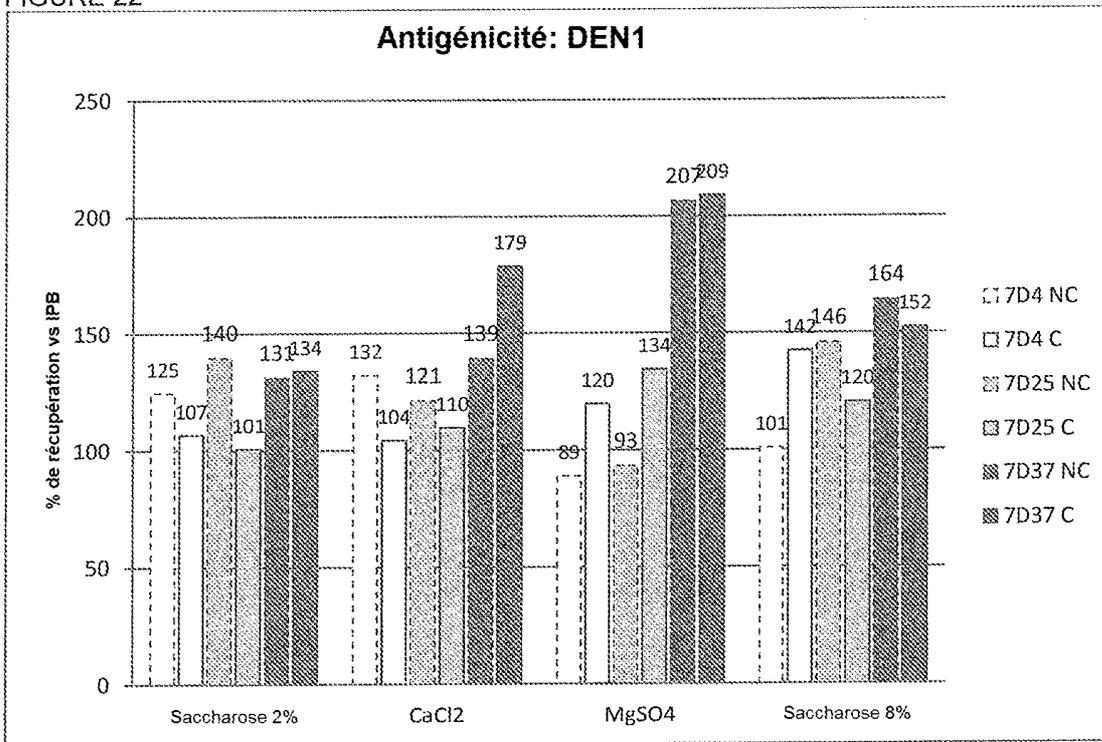


FIGURE 23

FIGURE 24

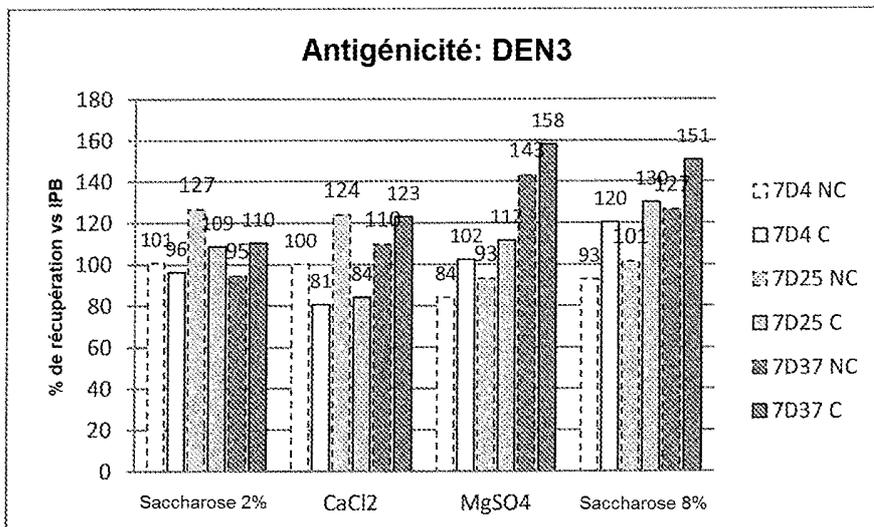


FIGURE 25

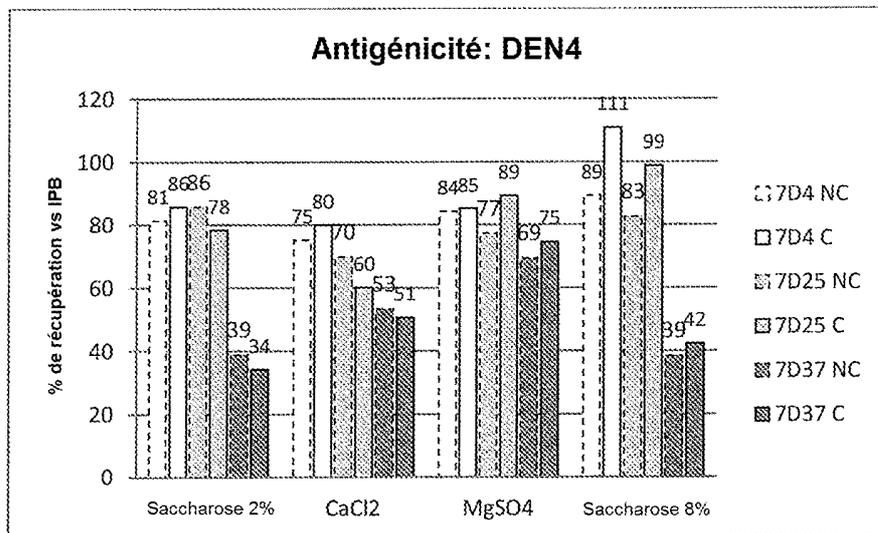


FIGURE 26

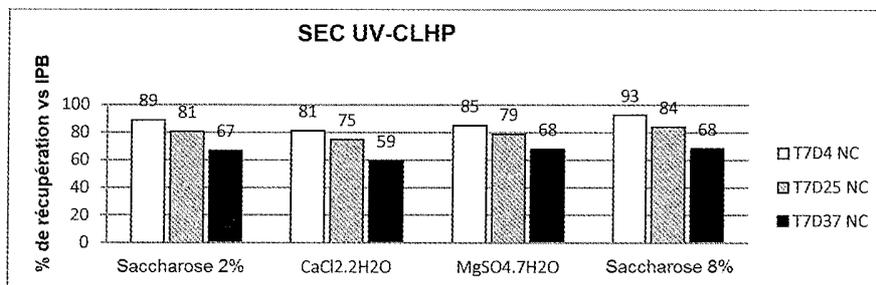
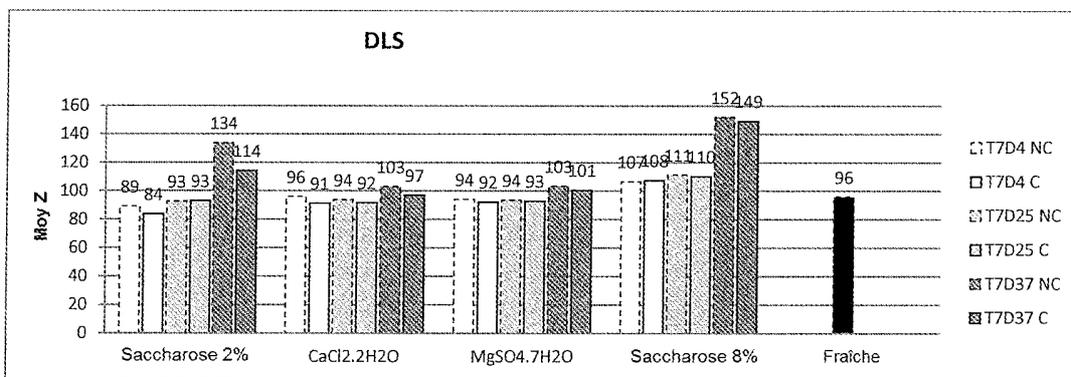


FIGURE 27

FIGURE 28

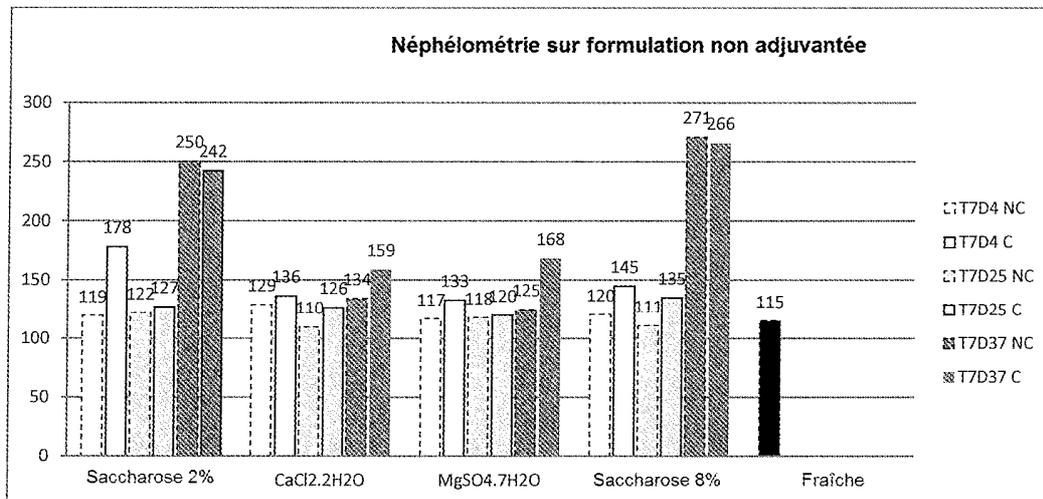


FIGURE 29

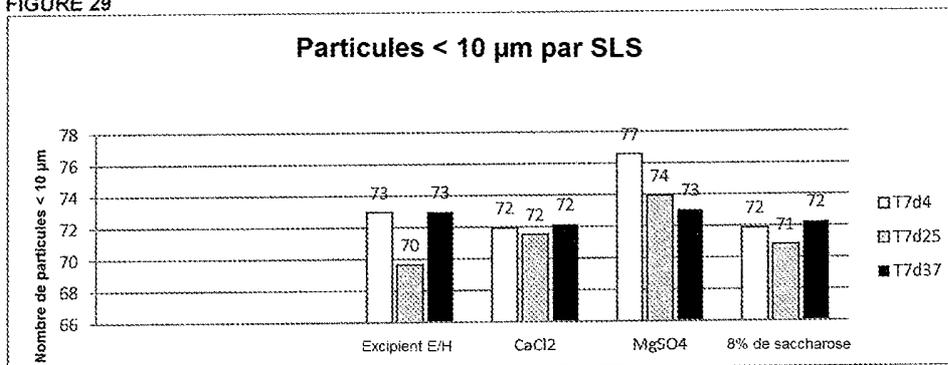


FIGURE 30

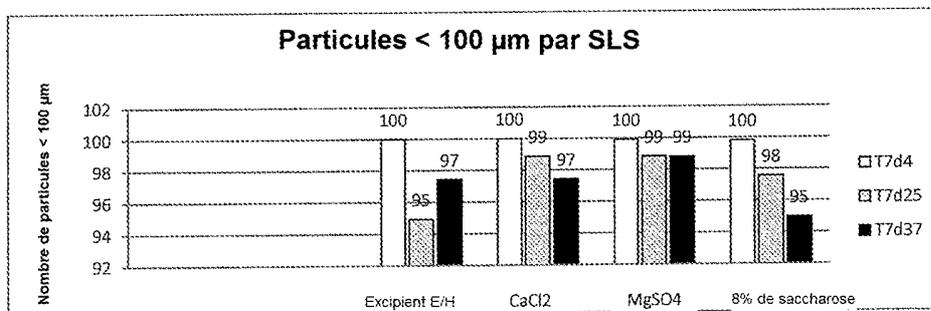
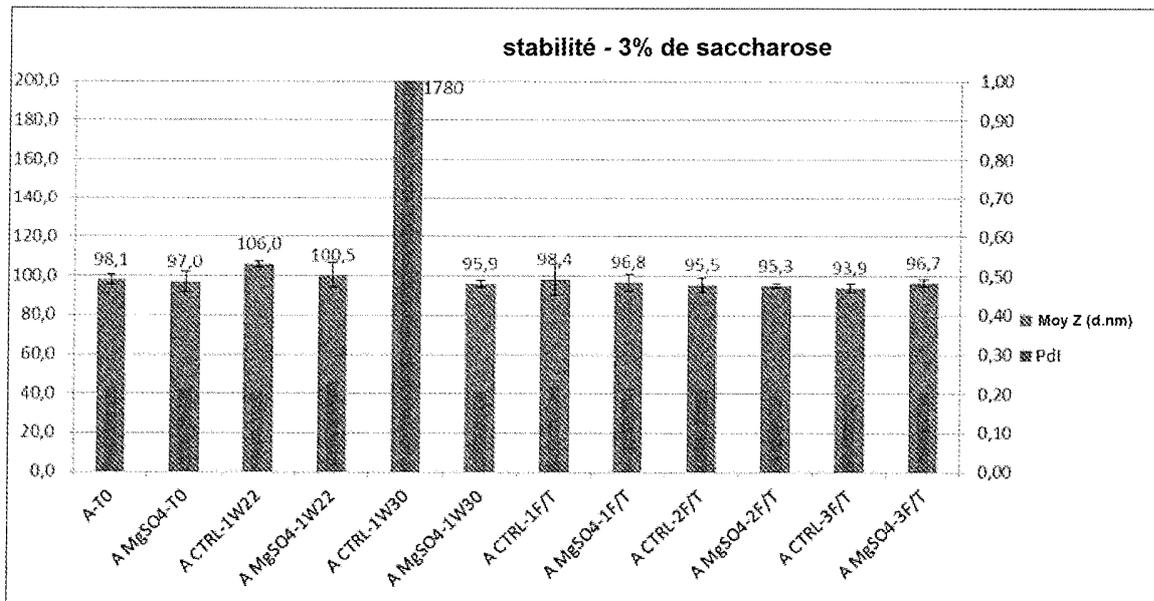


FIGURE 31



ABRÉGÉFORMULATION IMMUNOGÈNE

La présente invention concerne des formulations de compositions immunogènes comprenant une ou plusieurs souches de virus de la dengue inactivé et purifié.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Numero de la demande nationale

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1964

BO 11420
BE 201605950

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X,D Y	WO 2012/160199 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HENDERICKX VERONIQUE [BE]; LE BUSSY OL) 29 novembre 2012 (2012-11-29) * alinéa [0020] - alinéa [0022]; tableau 1 * * alinéa [0013] * * alinéa [0077] *	1,2, 7-25, 27-29 3-6	INV. A61K39/12 A61K39/00
Y	ADEBAYO A A ET AL: "Stability of 17D Yellow Fever virus vaccine using different stabilizers", BIOLOGICALS, ACADEMIC PRESS LTD., LONDON, GB, vol. 26, no. 4, 1 décembre 1998 (1998-12-01), pages 309-316, XP002504097, ISSN: 1045-1056, DOI: 10.1006/BIOL.1998.0157 * le document en entier *	3-6	
X	ONEIL WIGGAN ET AL: "Novel formulations enhance the thermal stability of live-attenuated flavivirus vaccines", VACCINE, vol. 29, no. 43, 29 juillet 2011 (2011-07-29), pages 7456-7462, XP028306509, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.07.054 [extrait le 2011-07-20]	1,2,7, 11,13, 18,19, 21,22, 24-26	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) A61K C12N
Y	* page 7458; figure 1; tableaux 1-4 *	3-6	
X	US 2008/248551 A1 (STINCHCOMB DAN T [US] ET AL) 9 octobre 2008 (2008-10-09)	1,2,7,8, 11,13, 15-19, 21,22, 24-28	
Y	* alinéa [0018] - alinéa [0020]; exemples 5,8; tableaux 2,3 *	3-6	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 mai 2017		Renggli-Zulliger, N	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document interclassaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

1

EP-O-FC/2014/1603/03/02/FR/404/05

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 11420
BE 201605950

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

22-05-2017

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication		
WO 2012160199 A1	29-11-2012	AU 2012260807 B2	12-05-2016		
		AU 2016210743 A1	25-08-2016		
		BR 112013030236 A2	06-12-2016		
		CA 2837145 A1	29-11-2012		
		CN 103619349 A	05-03-2014		
		CO 6811814 A2	16-12-2013		
		EA 201391515 A1	30-05-2014		
		EP 2714076 A1	09-04-2014		
		JP 2014515367 A	30-06-2014		
		KR 20140033171 A	17-03-2014		
		PE 06462014 A1	29-05-2014		
		SG 194950 A1	30-12-2013		
		US 2014112953 A1	24-04-2014		
		WO 2012160199 A1	29-11-2012		
		US 2008248551 A1	09-10-2008	AU 2008279576 A1	29-01-2009
				BR P10809663 A2	14-10-2014
CA 2720570 A1	29-01-2009				
CN 101679954 A	24-03-2010				
CN 104083757 A	08-10-2014				
CN 104998257 A	28-10-2015				
CO 6260150 A2	22-03-2011				
CU 20090169 A7	21-06-2012				
DK 2144998 T3	10-04-2017				
EP 2144998 A1	20-01-2010				
EP 2940129 A1	04-11-2015				
HK 1217168 A1	30-12-2016				
IL 201429 A	30-09-2013				
JP 5296775 B2	25-09-2013				
JP 2010523127 A	15-07-2010				
JP 2013209421 A	10-10-2013				
JP 2016041753 A	31-03-2016				
KR 20100016294 A	12-02-2010				
KR 20150082667 A	15-07-2015				
KR 20170038110 A	05-04-2017				
LT 2144998 T	25-04-2017				
MY 156422 A	26-02-2016				
NZ 580978 A	27-07-2012				
NZ 600958 A	29-05-2015				
SG 10201508397V A	27-11-2015				
US 2008248551 A1	09-10-2008				
US 2014302091 A1	09-10-2014				
US 2017100474 A1	13-04-2017				
WO 2009014774 A1	29-01-2009				
ZA 200907790 B	30-04-2014				

EPC FORM P0463

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82



OPINION ÉCRITE

Dossier N° BO11420	Date du dépôt (jour/mois/année) 20.12.2016	Date de priorité (jour/mois/année) 22.12.2015	Demande n° BE201605950
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K39/12 A61K39/00			
Déposant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle: citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Examineur Renggli-Zulliger, N

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201605950

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - un listage de la ou des séquences
 - un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - sur papier
 - sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - remis ultérieurement
3. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	3-6
	Non :	Revendications	1, 2, 7-29
Activité inventive	Oui :	Revendications	
	Non :	Revendications	1-29
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-29
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 WO 2012/160199 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HENDERICKX VERONIQUE [BE]; LE BUSSY OL) 29 novembre 2012 (2012-11-29)
- D2 ADEBAYO A A ET AL: "Stability of 17D Yellow Fever virus vaccine using different stabilizers",
BIOLOGICALS, ACADEMIC PRESS LTD., LONDON, GB,
vol. 26, no. 4, 1 décembre 1998 (1998-12-01), pages 309-316,
XP002504097,
ISSN: 1045-1056, DOI: 10.1006/BIOL.1998.0157
- D3 ONEIL WIGGAN ET AL: "Novel formulations enhance the thermal stability of live-attenuated flavivirus vaccines",
VACCINE,
vol. 29, no. 43, 29 juillet 2011 (2011-07-29), pages 7456-7462,
XP028306509,
ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.07.054
[extrait le 2011-07-20]
- D4 US 2008/248551 A1 (STINCHCOMB DAN T [US] ET AL) 9 octobre 2008 (2008-10-09)

Item V

Concernant le point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1 *Nouveauté*

- 1.1 D1 décrit une composition immunogène comprenant un virus de la dengue de sérotype 4 purifié, inactivé, comprenant un sérotype ou plus [13], un agent tampon [20], un tensioactif, comme le poloxamer, [19] et un agent améliorant la stabilité comme par exemple le saccharose [22] pouvant être utilisé pour des préparations en vrac. Des exemples de telles formulations sont trouvés par exemple dans le tableau 1 [77] et ils comprennent un tampon phosphate ou tris, 0,1% de poloxamer [88] et 3% de saccharose, 50mM NaCl (sel inorganique) et un adjuvant [87].

C'est pourquoi, l'objet des revendications 1, 2, 7-25, 27-29 n'est pas nouveau.

- 1.2. D3 décrit un vaccin inactivé de la dengue de sérotype 2 (Den2) dans différentes formulations (tableaux 1-4) comprenant, par exemple, 0,9mM Ca^{2+} et 0,5mM Mg^{2+} , 15% tréhalose, 2% poloxamer (F127) (page 458) (Figure 1B) dans un tampon phosphate.

C'est pourquoi, l'objet des revendications 1-2, 7, 8, 11, 13, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 26 n'est pas nouveau.

- 1.3. D4 qui correspond au brevet D3 décrit en essence le même enseignement (exemples 5, 8) que D3. Den-4 est décrit dans le tableau 3, les paragraphes [18-20] décrivent l'utilisation de saccharose et d'un surfactant Pluronic F127, le tableau 2 décrit un formulation de DEN-2 comprenant 10% de saccharose. Le poloxamer est considéré comme un adjuvant.

C'est pourquoi, l'objet des revendications 1-2, 7,8, 11,13,15-18,19,21,22, 24, 25-28 n'est pas nouveau.

2 *Activité inventive*

- 2.1 D1 est l'art antérieur le plus proche qui décrit un virus de la dengue de sérotype 4 purifié inactivé, comprenant un sérotype ou plus [13], un agent tampon [20], un tensioactif, comme le poloxamer, [19] et un agent améliorant la stabilité comme par exemple le saccharose [22] pouvant être utilisé pour des préparations en vrac.

La différence entre la présente demande et D1 est l'utilisation d'une combinaison de CaCl_2 , MgSO_4 et saccharose comme excipient améliorant la stabilité. Il n'ya pas d'effet technique particulier lié à cette combinaison spécifique.

Les exemples 8-9 de la présente demande utilisent 0,1% poloxamer (px188), 15nM CaCl_2 , 15mM MgSO_4 et 8% w/v de saccharose et démontrent que l'antigénicité est conservée tout en réduisant l'agrégation.

D2 décrit dans le tableau 1 l'utilisation du stabilisateur F comprenant 10% sucrose, 5% lactalbumine, 0,1g/l CaCl_2 et 0,076g/l MgSO_4 comme stabilisateur du virus de la fièvre jaune qui appartient aussi à la famille des flavivirus.

Par conséquent, il est considéré évident d'utiliser un stabilisateur qui a été utilisé avec succès pour stabiliser le virus de la fièvre jaune pour un autre membre de la même famille comme le virus de la dengue.

- 2.2 Il est noté qu l'utilisation de CaCl₂ et MgSO₄ pour stabiliser un virus en présence d'un sucre est déjà utilisé dans D3 pour le virus de la dengue. D3 et D4 utilisent le saccharose et le tréhalose comme sucre ce qui en fait des alternatives équivalentes pour stabiliser im virus inactivé.

C'est pourquoi, l'objet de la revendication 3 n'implique pas d'activité inventive.

Les conditions spécifiques utilisées dans le présence demande sont considérées évidentes, et l'homme du métier y arriverait en utilisant des expériences d'optimisation standard.

Par conséquent, l'objet des revendications 4-6 n'implique pas d'activité inventive, à moins qu'un effet technique inattendu soit lié à l'utilisation des conditions spécifiques pour la composition immunogénique revendiquée.