

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 881 139**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **05 00791**

⑤1 Int Cl⁸ : C 07 K 1/14 (2006.01), C 07 B 63/04, A 61 K 9/19

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 26.01.05.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 28.07.06 Bulletin 06/30.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR.

⑦2 Inventeur(s) : PASSOT STEPHANIE, FONSECA
FERNANDA et MARIN MICHELE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : GROSSET-FOURNIER CHANTAL
CATHERINE.

⑤4 COMPOSITION POUR LA LYOPHILISATION DE PROTEINES.

⑤7 La présente invention a pour objet l'utilisation de com-
positions liquides dans le cadre de la mise en oeuvre du pro-
cédé de lyophilisation sur des protéines, en vue de la
stabilisation de ces protéines, lesdites compositions
comprenant:

- un agent de charge ayant une température d'effondre-
ment comprise entre -18°C et 0°C,
- un agent stabilisateur,
- une solution tampon,
- et, le cas échéant, un agent surfactant non ionique.

FR 2 881 139 - A1



COMPOSITIONS POUR LA LYOPHILISATION DE PROTEINES

La présente invention a pour objet l'utilisation de compositions liquides dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé de lyophilisation sur des protéines déterminées, préalablement diluées dans ces compositions, en vue de la stabilisation de ces protéines à l'état sec après lyophilisation, et, le cas échéant à l'état liquide après réhydratation du lyophilisat obtenu.

La stabilité des protéines est généralement insuffisante pour permettre leur distribution et utilisation sous forme liquide [1]. Ainsi, pour assurer leur stabilité sur des périodes de stockage de plusieurs mois, les protéines sont lyophilisées. Le procédé de lyophilisation sous vide comporte trois étapes essentielles : (1) la congélation qui convertit la majeure partie de l'eau présente en glace ; (2) la dessiccation primaire qui permet la sublimation de la glace après diminution de la pression et augmentation de la température ; (3) la dessiccation secondaire qui permet la désorption de l'eau restante non congelée par augmentation de la température. Les produits lyophilisés, caractérisés par une teneur en eau résiduelle très faible (inférieure à 0,05 g d'eau par g de produit) présentent plusieurs avantages : une durée de vie de plusieurs années, un stockage à température ambiante ou à +4°C facilitant ainsi leur distribution et manipulation ainsi que des propriétés de réhydratation instantanée.

Cependant, même si le procédé de lyophilisation améliore la stabilité de la protéine, il génère différents stress susceptibles de dénaturer la protéine. L'ajout d'excipients, comme les sucres, polyols ou acides aminés, est donc nécessaire pour protéger la protéine lors des étapes de congélation et de déshydratation. D'autres excipients, comme les polymères, sels, ions, peuvent aussi être utilisés pour leurs propriétés d'agent de charge ou de pouvoir tampon. Une grande variété de molécules, seules ou en combinaisons, à diverses concentrations, assurant une protection efficace a été répertoriée dans la littérature [2]. Ainsi, l'étape de formulation est complexe et le développement de nouvelles protéines lyophilisées reste une démarche longue et empirique.

Récemment, Carpenter et al. [3] a énoncé une règle de formulation reposant sur l'association de quatre composés : (1) un agent tampon ne cristallisant pas lors de l'étape de congélation ; et/ou (2) un agent stabilisateur préservant la conformation de la protéine au sein d'une matrice solide amorphe (le plus souvent un disaccharide comme du saccharose ou du tréhalose), et/ou (3) un agent de charge assurant la stabilité physique du produit (mannitol,

glycine, hydroxyléthyl d'amidon ou albumine de sérum bovin), et/ou 4) un agent surfactant non ionique pour réduire l'agrégation des protéines. Néanmoins, à partir de cette règle, de multiples combinaisons demeurent possibles, en raison de la diversité des molécules et de leur concentration variable.

5. L'étape de formulation et le procédé de lyophilisation sont étroitement reliés entre eux. Le développement du procédé dépend des propriétés de la formulation choisie et inversement toute variation du procédé risque de modifier l'état physique de la formulation. De plus, la lyophilisation est un procédé long et coûteux en raison des temps de déshydratation importants, (cycles de un à plusieurs jours). Aujourd'hui, il devient donc indispensable de prendre en compte
10 le critère d'amélioration de la productivité du procédé dès l'étape de formulation en sélectionnant des excipients appropriés.

Considérant la conduite du procédé de lyophilisation, la dessiccation primaire, étape la plus longue du procédé, doit être pratiquée à la température produit la plus haute possible (T_{max}) résultant des conditions opératoires appliquées (température étagère et pression de la chambre).
15 Si la température du produit est supérieure à T_{max} , le matériau va perdre la structure poreuse formée lors de l'étape de congélation et s'effondrer sur lui-même, ce phénomène est appelé « collapse » ou « effondrement » [4]. Généralement les produits effondrés présentent des teneurs en eau résiduelle plus élevées, des temps de réhydratation plus longs. Même si l'activité biologique de la protéine peut être conservée, leur aspect visuel non conforme empêche leur
20 commercialisation. La valeur de T_{max} , associée à la température d'effondrement (T_{coll}) dépend des propriétés physiques du produit congelé. Si le matériau est essentiellement cristallin après congélation, T_{max} correspondra à la température eutectique (T_e) du soluté. En revanche, si le matériau est à l'état solide amorphe après congélation, T_{max} sera associée à la température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum (T_g'). Dans le cas de matériaux
25 complexes, comprenant des tissus ou des cellules par exemple, la valeur de la température d'effondrement T_{coll} (et donc T_{max}) sera comprise entre T_e ou la température de fusion et T_g' [5]. L'analyse enthalpique différentielle et la cryo-microscopie sont les deux méthodes généralement utilisées pour caractériser le comportement physique des formulations pharmaceutiques [4, 6-9]. La cryo-microscopie permet de déterminer visuellement la température
30 d'effondrement (T_{coll}), c'est-à-dire la température à partir de laquelle la sublimation de la glace s'accompagne de l'effondrement de la partie sèche [10].

La présente invention a essentiellement pour but de fournir des compositions liquides pour la lyophilisation :

- ne présentant pas d'excipient d'origine animale,
- assurant une bonne productivité du procédé de lyophilisation (cycle court et robustesse de la formule),
- préservant l'activité des protéines à applications pharmaceutiques au cours d'un stockage à l'état lyophilisé (conditions extrêmes : 6 mois à 25°C), et le cas échéant, au cours d'un stockage à l'état liquide après réhydratation (conditions extrêmes : 3 mois à 4°C).

Cherchant à développer une approche rationnelle pour la mise au point de formules lyophilisées en liaison avec la productivité du procédé, les inventeurs ont choisi de considérer la température de transition vitreuse (Tg') et la température d'effondrement (Tcoll) comme critères de sélection.

Les inventeurs ont ainsi mis en évidence que les compositions comprenant :

- un agent de charge ayant une température d'effondrement comprise entre -18°C et 0°C,
- un agent stabilisateur,
- une solution tampon,
- et, le cas échéant, un agent surfactant non ionique,

dans des proportions telles que la température d'effondrement de la composition ainsi obtenue est comprise entre -16°C et -10°C, permettaient d'atteindre l'objectif fixé.

A ce titre, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une composition liquide dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé de lyophilisation sur des protéines déterminées, préalablement diluées dans ladite composition, en vue de la stabilisation de ces protéines à l'état sec après lyophilisation, et, le cas échéant à l'état liquide après réhydratation du lyophilisat obtenu, ladite composition présentant une structure cristalline ou solide amorphe à l'état sec après lyophilisation, et comprenant :

- environ 40g/L à 60 g/L d'un agent de charge ayant une température d'effondrement comprise entre -18°C et 0°C,
- environ 10 g/L à 20 g/L d'un agent stabilisateur,
- environ 10 mM à 20 mM d'une solution tampon, ladite solution tampon ne cristallisant pas lors de la congélation de ladite composition,
- et, le cas échéant, environ 0,1 g/L à 0,4 g/L d'un agent surfactant non ionique,

ladite composition liquide étant telle que :

- * le ratio en masse de l'agent de charge sur l'agent stabilisateur est supérieur à 3 :1, lorsque ladite composition présente une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,
- * le ratio en masse de l'agent stabilisateur sur la protéine est supérieur à 1 :1,
- 5 * elle ne contient pas d'excipient d'origine animale,
- * elle a une température d'effondrement comprise entre -16°C et -10°C .

Par l'expression « agent de charge », dans ce qui précède et ce qui suit, on entend tout agent conférant une résistance mécanique au produit final, et contribuant à l'amélioration de l'aspect du produit lyophilisé et à la robustesse du matériau en réduisant les risques d'effondrement du produit au cours du procédé.

Par l'expression « température d'effondrement », dans ce qui précède et ce qui suit, on entend la température à partir de laquelle la sublimation de la glace s'accompagne d'une perte de structure de la région sèche du produit. Avantagusement, cette température est mesurée par cryomicroscopie selon les méthodes décrites dans la littérature [5, 10].

Par l'expression « agent stabilisateur », dans ce qui précède et ce qui suit, on entend tout composé protégeant la protéine au cours de la lyophilisation et du stockage. Il doit être pour partie au moins à l'état solide amorphe (état vitreux) après congélation et déshydratation, et être capable de remplacer l'eau en formant des liaisons hydrogène avec la protéine.

Avantagusement, comme indiqué ci-dessus, la solution tampon susmentionnée est telle qu'elle ne cristallise pas lors de la congélation de ladite composition (notamment à des températures de produit inférieures à -35°C , par exemple comprises entre -45°C et -35°C).

Par l'expression « agent surfactant non ionique », dans ce qui précède et ce qui suit, on entend tout composé réduisant l'adsorption de la protéine sur une surface (parois du flacons, bouchon, interface air-eau, interface eau-glace, par exemple) ; notamment quand la protéine est présente en très faible concentration.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, d'une composition telle que définie ci-dessus caractérisée en ce que l'agent de charge est choisi parmi :

- les polyols, tel que le mannitol ou l'inositol, de préférence le mannitol, ou les acides aminés, telle que la glycine ou l'alanine, de préférence la glycine, lorsque lesdites compositions présentent une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,
- ou les polysaccharides, notamment ceux ayant un dextrose équivalent (DE) inférieur à

10, tels que la maltodextrine, le dextrane, ou l'amidon hydroxyéthyl (encore désigné HES pour hydroxyethyl starch), de préférence la maltodextrine, lorsque lesdites compositions présentent une structure solide amorphe après lyophilisation.

Le dextrose équivalent (DE) susmentionné est un indice de comportement des polysaccharides qui varie comme l'inverse de la masse molaire. Une maltodextrine de DE 5 compris entre 6 et 10 présente une masse molaire d'environ 100 000 g/mol.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée, d'une composition telle que définie ci-dessus caractérisée en ce que l'agent stabilisateur est choisi parmi :

- 10 - le polyvinylpyrrolidone (PVP), ou l'alcool polyvinylique (PVA), à savoir des polymères présentant une masse molaire inférieure à 30 kDa, de préférence le PVP, lorsque lesdites compositions présentent une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,
- ou le saccharose, le tréhalose, le maltose ou le lactose, de préférence le saccharose, lorsque lesdites compositions présentent une structure solide amorphe après lyophilisation.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, d'une 15 composition telle que définie ci-dessus caractérisée en ce que l'agent surfactant est choisi parmi le Tween 80 (Polysorbate 80 : Polyoxyethylene sorbitan monooleate), le Tween 20 (Polysorbate 20 : Polyoxyethylene sorbitan monolaurate), le Triton X-100 (Octyl phenoxy polyethoxyethanol), ou le Brij 35 (Polyethylene glycol dodecyl ether), de préférence le Tween 80.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée, d'une 20 composition telle que définie ci-dessus caractérisée en ce que la solution tampon est une solution de Tris HCl (pH 7,8), ou de phosphate de potassium, de préférence une solution de Tris-HCl.

Avantageusement, les compositions liquides telles que définies ci-dessus, présentant une structure majoritairement cristalline à l'état sec après lyophilisation, comprennent:

- 25 - environ 40g/L à 60 g/L d'un agent de charge tel que défini ci-dessus,
- environ 10 g/L à 20 g/L d'un agent stabilisateur tel que défini ci-dessus,
- environ 10 mM à 20 mM d'une solution tampon telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, d'une composition liquide telle que définie ci-dessus, encore désignée MnP ci-après, présentant une structure solide majoritairement cristalline à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 30 - 40 g/L de mannitol en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L de polyvinylpyrrolidone (PVP) en tant qu'agent stabilisateur,

- et 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée, d'une composition liquide telle que définie ci-dessus, encore désignée GP ci-après, présentant une structure solide majoritairement cristalline à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 5
- 40 g/L de glycine en tant qu'agent de charge,
 - 10 g/L de polyvinylpyrrolidone en tant qu'agent stabilisateur,
 - et 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

Avantageusement, les compositions liquides telles que définies ci-dessus, présentant une structure solide amorphe à l'état sec après lyophilisation, comprennent:

- 10
- environ 40g/L à 60 g/L d'un agent de charge tel que défini ci-dessus,
 - environ 10 g/L à 20 g/L d'un agent stabilisateur tel que défini ci-dessus,
 - environ 10 mM à 20 mM d'une solution tampon telle que définie ci-dessus,
 - et environ 0,1 g/L à 0,4 g/L d'un agent surfactant non ionique tel que défini ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée, d'une composition
15 liquide telle que définie ci-dessus, encore désignée MdSW ci-après, présentant une structure solide amorphe à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 40 g/L de maltodextrine en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L de saccharose en tant qu'agent stabilisateur,
- 0,2 g/L de Tween 80 en tant qu'agent surfactant,
- 20 - et 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de compositions liquides telles que définies ci-dessus, caractérisée en ce que les protéines déterminées à lyophiliser sont des protéines d'intérêt pharmaceutique, ou analytique, notamment des protéines d'environ 2000 à 3000 acides aminés (ou de masse molaire d'environ 300 kDa), à une
25 concentration de 3 µg/mL à 10 µg/mL (soit entre 0.0003% et 0.001%) dans la composition liquide.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée, d'une composition liquide telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la stabilité des protéines lyophilisées est telle que l'activité des protéines après un stockage à l'état lyophilisé de 6 mois à 25°C est d'au
30 moins 80% de l'activité de ces mêmes protéines avant lyophilisation.

Le cas échéant, l'activité des protéines après réhydratation du lyophilisat avec de l'eau

osmosée et un stockage à l'état liquide de 3 mois à 4°C est d'au moins à 50% de l'activité de ces mêmes protéines avant lyophilisation ; à titre d'illustration, ce seuil de 50% est atteint dans le cas de la réhydratation du lyophilisat de la toxine A, lorsque cette dernière a été lyophilisée dans les compositions MnP, GP et MdSW susmentionnées, et dans le cas de la réhydratation du lyophilisat de la toxine B, lorsque cette dernière a été lyophilisée dans les compositions MnP et GP (voir la description détaillée ci-après).

L'invention a également pour objet un procédé de lyophilisation de protéines déterminées, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de dilution des protéines dans une composition telle que définie ci-dessus, dans des proportions telles que les protéines représentent environ 0.0003% à 0.001% de matière sèche dans la composition liquide (par exemple 0.0004% en toxine A et 0.0005% en toxine B),
- une étape de congélation de la solution obtenue lors de l'étape précédente à une température comprise entre -35°C et -45°C, notamment d'environ -38°C, à une vitesse comprise entre 0.3°C/min et 1°C/min,
- une étape de dessiccation primaire de la solution congelée obtenue lors de l'étape précédente par diminution de la pression (notamment à une pression d'environ 10 Pa à 20 Pa) et augmentation de la température de ladite solution congelée jusqu'à une valeur limite, inférieure à -18°C,
- une étape de dessiccation secondaire par augmentation de la température du produit jusqu'à environ 20°C à 26°C, et maintien du produit à cette température pendant un temps compris entre 6h et 10h.

Avantageusement le procédé susmentionné de lyophilisation selon l'invention, est caractérisé en ce que la durée de l'étape de dessiccation primaire est réduite d'un facteur compris entre 1.5 et 2, par rapport à la mise en oeuvre d'un procédé de lyophilisation classique n'utilisant pas les compositions liquides définies ci-dessus pour la stabilisation des protéines préalablement diluées dans lesdites compositions liquides.

L'invention concerne également l'application du procédé de lyophilisation tel que défini ci-dessus, à la stabilisation des protéines à l'état sec après lyophilisation, notamment dans les conditions décrites ci-dessus.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention de protéines stable en solution, notamment dans les conditions décrites ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de

réhydratation du lyophilisat, obtenu par mise en œuvre du procédé de lyophilisation tel que défini ci-dessus, avec de l'eau osmosée.

L'invention concerne également un procédé de criblage de compositions liquides telles que définies ci-dessus, pour la mise en œuvre du procédé de lyophilisation sur des protéines déterminées, lesdites compositions liquides étant choisies parmi celles pour lesquelles :

- l'activité des protéines après un stockage à l'état lyophilisé de 6 mois à 25°C est d'au moins 80% de l'activité de ces mêmes protéines avant lyophilisation,

- le cas échéant, l'activité des protéines après réhydratation du lyophilisat avec de l'eau osmosée et un stockage à l'état liquide de 3 mois à 4°C est d'au moins 50% de l'activité de ces mêmes protéines avant lyophilisation.

- la température d'effondrement (Tcoll) des compositions liquides est comprise entre -16°C et -10°C.

L'invention a également pour objet une composition liquide, présentant une structure cristalline ou solide amorphe à l'état sec après lyophilisation, et comprenant :

- environ 40g/L à 60 g/L d'un agent de charge ayant une température d'effondrement comprise entre -18°C et 0°C,

- environ 10 g/L à 20 g/L d'un agent stabilisateur,

- environ 10 mM à 20 mM d'une solution tampon, ladite solution tampon ne cristallisant pas lors de la congélation de ladite composition,

- et, le cas échéant, environ 0,1 g/L à 0,4 g/L d'un agent surfactant non ionique,

ladite composition liquide étant telle que :

* le ratio en masse de l'agent de charge sur l'agent stabilisateur est supérieur à 3 :1, lorsque ladite composition présente une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,

* le ratio en masse de l'agent stabilisateur sur la protéine est supérieur à 1 :1,

* elle ne contient pas d'excipient d'origine animale,

* elle a une température d'effondrement comprise entre -16°C et -10°C.

L'invention concerne plus particulièrement une composition liquide telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que l'agent de charge est choisi parmi :

- les polyols, tel que le mannitol ou l'inositol, de préférence le mannitol, ou les acides aminés, telle que la glycine ou l'alanine, de préférence la glycine, lorsque lesdites compositions présentent une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,

- ou les polysaccharides, notamment ceux ayant un dextrose équivalent (DE) inférieur à 10, tels que la maltodextrine, le dextrane ou l'amidon hydroxyéthyl, de préférence la maltodextrine, lorsque lesdites compositions présentent une structure solide amorphe après lyophilisation.

5 L'invention a plus particulièrement pour objet une composition liquide telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que l'agent stabilisateur est choisi parmi :

- le polyvinylpyrrolidone (PVP), ou l'alcool polyvinylique (PVA), de préférence lePVP, lorsque lesdites compositions présentent une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,

10 - ou le saccharose, le tréhalose, le maltose ou le lactose, de préférence le saccharose, lorsque lesdites compositions présentent une structure solide amorphe après lyophilisation.

L'invention concerne plus particulièrement une composition liquide telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que l'agent surfactant est choisi parmi le Tween 80, le Tween 20, le Triton X-100 ou leBrij 35, de préférence le Tween 80.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet une composition liquide telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution de Tris HCl (pH 7,8), ou de phosphate de potassium, de préférence une solution de Tris-HCl.

L'invention concerne plus particulièrement une composition liquide telle que définie ci-dessus, présentant une structure majoritairement cristalline à l'état sec après lyophilisation, et
20 comprenant:

- 40 g/L de mannitol en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L de polyvinylpyrrolidone en tant qu'agent stabilisateur,
- 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

L'invention a plus particulièrement pour objet une composition liquide telle que définie ci-dessus, présentant une structure majoritairement cristalline à l'état sec après lyophilisation, et
25 comprenant:

- 40 g/L de glycine en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L de polyvinylpyrrolidone en tant qu'agent stabilisateur,
- 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

30 L'invention a plus particulièrement pour objet une composition liquide telle que définie ci-dessus, présentant une structure solide amorphe à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 40 g/L de maltodextrine en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L dans la composition liquide de saccharose en tant qu'agent stabilisateur,
- 0,2 g/L de Tween 80 en tant qu'agent surfactant,
- 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

5 L'invention concerne également une composition liquide telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend une protéine déterminée choisie parmi les protéines d'intérêt pharmaceutique, ou analytique, notamment des protéines d'environ 2000 à 3000 acides aminés (ou de masse molaire d'environ 300 kDa), à une concentration d'environ entre 3 µg/mL et 10 µg/mL (soit 0.0003% et 0.001%) dans la composition liquide.

10 La présente invention sera davantage détaillée à l'aide de la description qui suit des compositions liquides telles que définies ci-dessus, de leur utilisation dans le cadre de la mise en œuvre de la lyophilisation des toxines A et B de *Clostridium difficile*, et de la meilleure stabilité de ces protéines ainsi lyophilisées par rapport aux mêmes protéines lyophilisées par les techniques classiques dans ce domaine.

15

I. Démarche

1) Règles de mélange

a) En raison des contraintes de sécurité sanitaires, aucun excipient d'origine animale n'a été utilisé. Ainsi la l'albumine de sérum bovin (BSA), souvent proposée dans la littérature comme agent de charge et stabilisateur a été écartée.

b) Après la sélection de 8 molécules, un criblage préliminaire des compositions liquides a été effectué d'après leurs propriétés physiques. 29 compositions liquides (**cf. Tableau I**) ont été finalement établies selon la règle suivante :

« Tous les mélanges contiennent au minimum :

25 - un agent de charge (et/ou stabilisateur) présent à une concentration comprise entre 40 g/L et 60 g/L et conférant une résistance mécanique à la structure poreuse lors du départ de la glace et évitant ainsi l'entraînement de la protéine avec la vapeur d'eau lors de l'étape de dessiccation primaire,

30 - et un agent tampon ne cristallisant pas lors de l'étape de congélation, soit un tampon Tris-HCl présent à une concentration de 10 mM. »

Tableau I. Composition des 29 compositions liquides testées (a)

	Agent de charge (cristallin)		Agent de charge et/ ou Stabilisateur (solide amorphe) (b)		Stabilisateur (solide amorphe)		Cryoprotecteur	Surfactant
	Glycine	Mannitol	PVP (25 KDa)	Maltodextrine (5-8 DE)	Sucrose	Maltose		
	G	Mn	P	Md	S	M		
Md				40 g/L				
MdW				40 g/L				0.02%
MdSW				40 g/L	10 g/L			0.02%
MdS				40 g/L	10 g/L			
MdE				40 g/L			10 g/L	
MdSE				40 g/L	10 g/L		10 g/L	
P			40 g/L					
PE			40 g/L				10 g/L	
PW			40 g/L					0.02%
PS			40 g/L		10 g/L			
PM			40 g/L			10 g/L		
PSW			40 g/L		10 g/L			0.02%
G	40 g/L							
GM	40 g/L					10 g/L		
GS	40 g/L				10 g/L			
GSW	40 g/L				10 g/L			0.02%
GSE	40 g/L				10 g/L		10 g/L	
GE	40 g/L						10 g/L	
GW	40 g/L							0.02%
GMd	40 g/L			10 g/L				
GP	40 g/L		10 g/L					
GPW	40 g/L		10 g/L					0.02%
GPE	40 g/L		10 g/L				10 g/L	
Mn	40 g/L							
MnP		40 g/L	10 g/L					
MnS		40 g/L			10 g/L			
MnW		40 g/L						0.02%
MnPW		40 g/L	10 g/L					0.02%
S					40 g/L			

(a) Critère de définition des 29 formules :

Tous les mélanges contiennent au minimum :

- 5 - un agent de charge et/ou stabilisateur,
 - et un tampon constitué d'une solution 10 mM de tris-HCl (pH 7.8),
 d'ou une formule à un taux final voisin de 4% à 6% de matière sèche.

Les formules présentent une concentration finale en toxine A et en toxine B de 5.14µg/mL et 3.88µg/mL respectivement.

- 10 **(b) :** Ces agents de charge peuvent aussi jouer le rôle de stabilisateur et, dans ce cas, si cette molécule est associée à un autre agent de charge, elle n'est ajoutée qu'à 10 g/L.

2) Mesure des propriétés physiques des compositions liquides et évaluation de la stabilité des protéines lyophilisées avec ces compositions

a) Afin de sélectionner la composition liquide répondant au compromis « stabilité » des protéines et « bonne productivité » du procédé de lyophilisation, les propriétés physiques (températures de transition vitreuse et d'effondrement) ont été mesurées.

b) La stabilité des protéines a été évaluée après lyophilisation, après 6 mois de stockage à 25°C à l'état lyophilisé et après 3 mois de stockage à 4°C à l'état liquide après réhydratation. La méthode de suivi de l'activité des protéines est spécifique des protéines étudiées.

II. Matériels et Méthodes

1) Protéines de l'étude

Deux protéines modèles ont été étudiées : les toxines A et B produites par *Clostridium difficile*. Ces protéines sont utilisées dans des kits de diagnostic et doivent être réhydratées avant utilisation. Les toxines A et B sont des protéines de taille importante (de 260 à 308 KDa). Ces protéines ont été obtenues en laboratoire industriel et introduites dans les compositions liquides à raison d'une concentration finale en toxine A et en toxine B de 5.14µg/mL et 3.88µg/mL respectivement (Tableau I).

2) Analyse enthalpique différentielle

L'analyse thermique des solutions et des produits lyophilisés a été conduite à l'aide d'un calorimètre différentiel à balayage à compensation de puissance (DSC, modèle Pyris 1; Perkin Elmer LLC, Norwalk, CT, USA) équipé d'une source d'azote liquide (CryoFill, Perkin Elmer). L'étalonnage de l'équipement a été réalisé à l'aide du cyclohexane, du mercure et du gallium. 15 µL d'échantillon liquide, ou 10 mg d'échantillon lyophilisé ont été placés dans une capsule d'aluminium et une capsule vide a été utilisée comme référence. Les vitesses de refroidissement et de chauffage ont été fixées à 10°C.min⁻¹. La température de transition vitreuse est définie comme la valeur médiane de la variation de chaleur spécifique associée à l'événement de transition vitreuse.

Les échantillons liquides ont été refroidis jusqu'à -120°C puis chauffés jusqu'à 25°C. Ce cycle thermique a été répété. Pour certains échantillons liquides comprenant un agent de charge cristallin, des cycles thermiques spécifiques ont été appliqués afin de favoriser la cristallisation totale de l'agent de charge (mannitol ou glycine).

Les échantillons lyophilisés ont été refroidis jusqu'à -40°C puis chauffés jusqu'à 200°C . Pour éliminer toute interférence du signal avec des phénomènes de relaxation enthalpique, des cycles thermiques spécifiques ont été appliqués tels qu'un maintien en isotherme (« annealing »), ou une répétition de séquence de courtes étapes de chauffage et de maintien (logiciel Stepscan
5 DSC de Perkin Elmer).

3) Cryo-microscopie

La température d'effondrement (dite de collapse, T_{coll}) a été mesurée en utilisant une cellule de cryo-dessiccation (Linkam Scientific Instruments, Surrey, UK) équipée d'un système de refroidissement à l'azote et d'un programmeur de température. Un échantillon de $5\ \mu\text{L}$ a été
10 placé sur une lame de quartz de 16 mm de diamètre et recouvert d'une lamelle de quartz de 13 mm de diamètre. Un gabarit métallique, placé entre les deux lames, assure une épaisseur constante de l'échantillon. De l'huile de silicone a été déposée entre l'échantillon et la plaque de régulation de la température. Les observations directes de la structure lyophilisée ont été obtenues par l'intermédiaire d'un microscope de type Nikon Elipse E600 (Nikon, Japan). La température
15 d'effondrement (T_{coll}) déterminée correspond à la température minimale à partir de laquelle, au cours de la lyophilisation, il y a perte de la structure établie lors de la congélation [5].

Le protocole de mesure est décrit dans une publication antérieure [5]. L'échantillon a été congelé à $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à une température légèrement inférieure à sa valeur de T_g . Après abaissement de la pression dans la cellule (environ 1 Pa), la température de l'échantillon a été
20 maintenue pendant 10 à 20 min jusqu'à l'obtention d'une région sèche suffisamment large pour détecter une détérioration de la structure. Puis, la température a été progressivement augmentée par pas de 5°C , ou 1°C lorsque le début d'effondrement a été observé. Pour les compositions comprenant un agent de charge cristallin (mannitol ou glycine), une étape de maintien à -20°C pendant 20 min a été appliquée après l'étape de congélation pour permettre la cristallisation totale
25 de l'agent de charge.

4) Cycle de lyophilisation

Les compositions liquides ont été réparties dans des flacons en verre de 4 mL (avec un volume final de 1 mL). Les flacons préalablement déposés dans un plateau ont été placés sur l'étagère d'un lyophilisateur SMH 15 (Usifroid, Maurepas, France). Les étapes suivantes ont été
30 appliquées: (1) refroidissement de l'étagère jusqu'à -60°C à une vitesse de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et maintien de l'étagère à -60°C pendant 2 heures ; (2) diminution de la pression jusqu'à 10 Pa, augmentation

de la température étagère à -25°C et maintien de l'étagère à -25°C pendant 50h ; (3) augmentation de la température étagère jusqu'à 25°C et maintien de la température pendant 8h. A la fin du cycle, le vide a été cassé par injection d'un courant d'azote gazeux sec, les flacons ont rapidement été bouchés et conditionnés sous vide dans des sachets en aluminium.

5 Des thermocouples (types K) ont été placés au fond de deux flacons afin de suivre la température du produit. Pendant la sublimation (dessiccation primaire), la température du produit a été maintenue à environ -34°C .

5) Mesure de l'activité antigénique

10 L'activité antigénique des toxines A et B a été mesurées par un test quantitatif de type ELISA, développé par bioMérieux. L'activité a été mesurée immédiatement après lyophilisation, après un stockage de 6 mois à 25°C à l'état lyophilisé et après un stockage de 3 mois à 4°C à l'état liquide après réhydratation. Le coefficient de variation de cette méthode de dosage est de 15%.

15 **III. Résultats**

1) Les propriétés physiques (cf. Tableau II)

Selon le comportement physique de l'agent de charge lors de la congélation, les 29 compositions liquides sont classées en deux catégories :

- les compositions comportant un agent de charge présent à l'état solide amorphe après
20 congélation : elles sont caractérisées par une valeur de la température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée (T_g') proche de la température d'effondrement (T_{coll}). Les compositions à base de maltodextrine possèdent des valeurs de T_{coll} supérieures de 10°C à celles des compositions à base de polyvinylpyrrolidone (PVP).
- les compositions comportant un agent de charge présent à l'état cristallin après congélation :
25 elles sont caractérisées par des valeurs de T_{coll} largement supérieures (de 10°C à 20°C) aux valeurs de T_g' .

La température d'effondrement T_{coll} , représentatif de la perte de la structure lyophilisée apparaît comme un critère plus pertinent à considérer pour l'optimisation du procédé de lyophilisation.

Tableau II. Synthèse des propriétés physiques des 29 compositions liquides étudiées

	DSC		Cryo-microscopie	
	Tg' (°C)	Te (°C)	Tcoll (°C)	Tmelt (°C)
<u>Solide amorphe (Tg' voisin de Tcoll)</u>				
Md	-13		-10	
MdW	-14		-9	
MdSW	-15		-14	
MdS	-17		-14	
MdE	-10	-18	-15	
MdSE	-16	-21	-18	
P	-27		-25	
PE	-23	-22	-26	
PW	-26		-26	
PM	-24		-26	
PS	-28		-27	
PSW	-28		-27	
S	-36		-35	
<u>Solide cristallin (Tg' << Tcoll)</u>				
G*	—	-4	-16	-5/-4
GM*	-37	-4	-15	-5/-4
GS*	-38	-4	-15	-5/-4
GSW*	-39	-4	-15	-5/-4
GSE*	-38	-19 ; -4	-18	-5/-4
GE*	—	-17 ; -4	-16	-5/-4
GW*	—	-4	-20	-5/-4
GMd*	-20	-4	-10	-5/-4
GP*	-28	-4	-15	-5/-4
GPW*	-27	-4	-15	-5/-4
GPE*	—	-18 ; -4	-18	-5/-4
Mn*	-32; -25	-2	-10	-3/-2
MnP*	-25	-2	-14	-3/-2
MnS*	-38	-2	-20	-3/-2
MnW*	-32 ; -25	-2	-10	-3/-2
MnPW*	-26	-2	-15	-3/-2

(a) mesurée par DSC, valeur moyenne de deux mesures au minimum

(b) mesurée par cryomicroscopie, valeur moyenne de deux mesures au minimum

5 Tg' : Température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée

Tcoll : Température de collapse (effondrement)

Te : Température eutectique

Tmelt : Température de fusion de la solution

* : Application d'un cycle thermique spécifique permettant la cristallisation complète de l'argent de charge

10 (mannitol, glycine)

2) L'activité des protéines (cf. Tableau III)

Immédiatement après lyophilisation, l'activité antigénique des deux protéines représente plus de 80% de l'activité antigénique avant lyophilisation pour l'ensemble des compositions liquides testées. Aucune perte d'activité antigénique n'a été donc observée.

5. En vue de la sélection des compositions liquides les plus performantes, les critères de stabilité suivants ont été retenus : une activité antigénique supérieure à 80% de la valeur avant lyophilisation après un stockage de 6 mois à 25°C à l'état lyophilisé et/ou une activité antigénique d'au moins 50% après un stockage de 3 mois à 4°C à l'état liquide.

10 Les compositions liquides MnP et GP, incluant 4% d'un agent de charge cristallin (mannitol ou glycine, respectivement) et 1% d'un agent stabilisateur, le polyvinylpyrrolidone, assurent la stabilité des deux protéines aussi bien à l'état lyophilisé qu'à l'état liquide. L'ajout d'un agent surfactant non ionique, le Tween 80 (noté W), n'améliore pas significativement la stabilité des deux protéines (cf MnPW et GPW par rapport à MnP et GP, respectivement).

15 La composition liquide MdSW, incluant 4% de maltodextrine, 1% de saccharose et 0,02% de Tween 80, apparaît très efficace pour la stabilisation des deux protéines à l'état lyophilisé.

De plus, ces trois compositions liquides (MnP, GP et MdSW) présentent des valeurs de température d'effondrement T_{coll} élevées (-15°C à -14°C), rendant ainsi possible le raccourcissement du cycle de lyophilisation.

Tableau III. Activité antigénique des protéines lyophilisées après un stockage de 6 mois à 25°C à l'état sec et après un stockage de 3 mois à 4°C à l'état liquide après réhydratation

	T coll (°C)	Toxine A		Toxine B	
		Sec	Liquide	Sec	Liquide
		6 mois à 25°C	3 mois à 4°C	6 mois à 25°C	3 mois à 4°C
Solide amorphe					
Md	-10	54	0	68	6
MdW	-9	81	5	89	5
MdSW	-14	86	50	89	8
MdS	-14	61	0	78	3
MdE	-15	83	96	77	12
MdSE	-18	88	77	65	15
P	-25	72	68	94	82
PE	-26	89	85	73	62
PW	-26	81	67	103	96
PM	-26	90	95	75	44
PS	-27	85	79	87	83
PSW	-27	96	81	111	110
S	-35	94	7	90	14
Solide cristallin					
G	-16	17	59	55	97
GM	-15	71	100	75	86
GS	-15	84	72	80	27
GSW	-15	74	86	101	139
GSE	-18	72	84	77	110
GE	-16	30	18	61	90
GW	-20	7	85	48	93
GMd	-10	67	6	83	11
GP	-15	87	72	96	48
GPW	-15	90	85	92	55
GPE	-18	77	83	91	95
Mn	-10	21	95	43	51
MnP	-14	95	84	89	70
MnS	-20	84	46	78	63
MnW	-10	11	83	60	122
MnPW	-15	99	43	102	13

- 5 (a) L'unité dans laquelle est exprimée l'activité de la protéine est le pourcentage calculé par rapport à l'activité antigénique avant lyophilisation, sachant que l'activité immédiatement après lyophilisation est supérieure à 80%. La valeur donnée résulte de la moyenne de deux mesures. On prend pour critère de stabilité une activité supérieure ou égale à 80.

Bibliographie

[1] Manning MC, Patel K, Borchardt RT. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research* 1989;6(11):903-18.

5 [2] Passot S, Fonseca F, Alarcon-Lorca M, Rolland D, Marin M. Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* Submitted.

[3] Carpenter JF, Chang BS, Garzon-Rodriguez W, Randolph TW. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice. *Pharmaceutical Biotechnology*
10 2002;13:109-33.

[4] Pikal MJ, Shah S. The collapse temperature in freeze drying : Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy state. *International Journal of Pharmaceutics* 1990;62:165-186.

[5] Fonseca F, Passot S, Cunin O, Marin M. Collapse Temperature of Freeze-Dried
15 *Lactobacillus bulgaricus* Suspensions and Protective Media. *Biotechnology Progress* 2004;20:229-238.

[6] MacKenzie AP. Collapse during freeze-drying - qualitative and quantitative aspects. In: Goldblith SA, Rey L, Rothmayr WW, editors. *Freeze-drying and advanced food technology*. New York: Academic Press; 1974. p. 277-307.

20 [7] Chang B, Randall C. Use a Subambient Thermal Analysis to Optimize Protein-Lyophilization. *Cryobiology* 1992;29:632-656.

[8] Her LM, Nail SL. Measurement of glass transition temperatures of freeze-concentrated solutes by differential scanning calorimetry. *Pharmaceutical Research* 1994;11(1):54-59.

[9] Nail SL, Jiang S, Chongprasert S, Knopp SA. Fundamentals of freeze-drying. In: Nail
25 SL, Akers MJ, editors. *Development and manufacture of protein pharmaceutical*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. p. 281-360.

[10] Nail SL, Her LM, Proffitt CPB, Nail LL. An improved microscope stage for direct observation of freezing and freeze drying. *Pharmaceutical Research* 1994;11(8):1098-1100.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une composition liquide dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé
5 de lyophilisation sur des protéines déterminées préalablement diluées dans ladite composition,
en vue de la stabilisation de ces protéines à l'état sec après lyophilisation, et, le cas échéant à
l'état liquide après réhydratation du lyophilisat obtenu, ladite composition présentant une
structure majoritairement cristalline ou solide amorphe à l'état sec après lyophilisation, et
comprenant :

10 - environ 40g/L à 60 g/L d'un agent de charge ayant une température d'effondrement
comprise entre -18°C et 0°C ,

- environ 10 g/L à 20 g/L dans la composition liquide d'un agent stabilisateur,

- environ 10 mM à 20 mM d'une solution tampon, ladite solution tampon ne
cristallisant pas lors de la congélation de ladite composition,

15 - et, le cas échéant, environ 0,1 g/L à 0,4 g/L d'un agent surfactant non ionique,
ladite composition liquide étant telle que :

* le ratio en masse de l'agent de charge sur l'agent stabilisateur est supérieur à 3 :1,
lorsque ladite composition présente une structure majoritairement cristalline après
lyophilisation

20 * le ratio en masse de l'agent stabilisateur sur la protéine est supérieur à 1 :1,

* elle ne contient pas d'excipient d'origine animale,

* elle a une température d'effondrement comprise entre -16°C et -10°C .

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'agent de charge est choisi
25 parmi :

- les polyols, tel que le mannitol ou l'inositol, de préférence le mannitol ou les acides
aminés, telle que la glycine ou l'alanine, de préférence la glycine, lorsque lesdites
compositions présentent une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,

30 - ou les polysaccharides, notamment ceux ayant un dextrose équivalent (DE) inférieure
à 10, tels que la maltodextrine, le dextrane, ou l'amidon hydroxyéthyl, de préférence la
maltodextrine, lorsque lesdites compositions présentent une structure solide amorphe après
lyophilisation.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'agent stabilisateur

est choisi parmi :

- le polyvinylpyrolidone (PVP), ou l'alcool polyvinylique (PVA), de préférence le PVP, lorsque lesdites compositions présentent une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,

5 - ou le saccharose, le tréhalose, le maltose ou le lactose, de préférence le saccharose, lorsque lesdites compositions présentent une structure solide amorphe après lyophilisation.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'agent surfactant est choisi parmi le Tween 80, le Tween 20, le Triton X-100, ou le Brij 35, de
10 préférence le Tween 80.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution de Tris HCl (pH 7,8), ou de phosphate de potassium, de préférence une solution de Tris-HCl.

15

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, d'une composition liquide, présentant une structure majoritairement cristalline à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 40 g/L de mannitol en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L de polyvinylpyrolidone en tant qu'agent stabilisateur,
- 20 - 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, d'une composition liquide, présentant une structure majoritairement cristalline à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 40 g/L de glycine en tant qu'agent de charge,
- 25 - 10 g/L de polyvinylpyrolidone en tant qu'agent stabilisateur,
- 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, d'une composition liquide, présentant une structure solide amorphe à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 30 - 40 g/L de maltodextrine en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L de saccharose en tant qu'agent stabilisateur,
- 0,2 g/L de Tween 80 en tant qu'agent surfactant,
- 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que les protéines déterminées sont des protéines d'intérêt pharmaceutique, ou analytique, notamment des protéines d'environ 2000 à 3000 acides aminés (ou de masse molaire d'environ 300 kDa), représentant environ entre 3 µg/mL et 10 µg/mL (soit 0.0003% et 0.001%) de matière sèche dans la composition liquide.

10. Procédé de lyophilisation de protéines déterminées, caractérisé en ce qu'il comprend:

- une étape de dilution des protéines dans une composition telle que définie dans l'une des revendications 1 à 8, dans des proportions telles que les protéines représentent environ 0.0003% à 0.001% de matière sèche dans la composition liquide,

- une étape de congélation de la solution obtenue lors de l'étape précédente à une température de produit comprise entre -35°C et -45°C, notamment d'environ -38°C, à une vitesse comprise entre 0.3°C/min et 1°C/min,

- une étape de dessiccation primaire de la solution congelée obtenue lors de l'étape précédente par diminution de la pression et augmentation de la température de ladite solution congelée jusqu'à une température limite inférieure à -18°C,

- une étape de dessiccation secondaire par augmentation de la température du produit jusqu'à environ 20°C à 26°C pendant un temps compris entre 6h et 10h.

11. Application du procédé de lyophilisation selon la revendication 10, à la stabilisation des protéines à l'état sec après lyophilisation.

12. Procédé d'obtention de protéines sous forme stabilisée en solution, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de réhydratation du lyophilisat obtenu par mise en œuvre du procédé de lyophilisation selon la revendication 10.

13. Procédé de criblage de compositions liquides telles que définies dans l'une des revendications 1 à 5, pour la mise en œuvre de procédés de lyophilisation de protéines déterminées, lesdites compositions liquides étant choisies parmi celles pour lesquelles :

- l'activité des protéines après un stockage à l'état lyophilisé de 6 mois à 25°C est d'au moins 80% de l'activité de ces mêmes protéines avant lyophilisation,

- le cas échéant, l'activité des protéines après réhydratation du lyophilisat et un stockage à l'état liquide de 3 mois à 4°C est d'au moins 50% de l'activité de ces mêmes protéines avant

lyophilisation.

- la température d'effondrement des compositions liquides est comprise entre -16°C et -10°C .

5 14. Composition liquide, présentant une structure majoritairement cristalline ou solide amorphe à l'état sec après lyophilisation, et comprenant :

- environ 40g/L à 60 g/L d'un agent de charge ayant une température d'effondrement comprise entre -18°C et 0°C ,

- environ 10 g/L à 20 g/L d'un agent stabilisateur,

10 - environ 10 mM à 20 mM d'une solution tampon, ladite solution tampon ne cristallisant pas lors de la congélation de ladite composition,

- et, le cas échéant, environ 0,1 g/L à 0,4 g/L d'un agent surfactant non ionique, ladite composition liquide étant telle que :

* le ratio en masse de l'agent de charge sur l'agent stabilisateur est supérieur à 3 :1, lorsque ladite composition présente une structure majoritairement cristalline après lyophilisation

* le ratio en masse de l'agent stabilisateur sur la protéine est largement supérieur à 1 :1,

* elle ne contient pas d'excipient d'origine animale,

20 * elle a une température d'effondrement comprise entre -16°C et -10°C .

15 15. Composition liquide selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'agent de charge est choisi parmi :

- les polyols, tel que le mannitol ou l'inositol, de préférence le mannitol, ou les acides aminés, telle que la glycine ou l'alanine, de préférence la glycine lorsque lesdites compositions présentent une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,

- ou les polysaccharides, notamment ceux ayant un dextrose équivalent (DE) inférieur à 10, tels que la maltodextrine, le dextrane, ou l'amidon hydroxyéthyl, de préférence la maltodextrine, lorsque lesdites compositions présentent une structure solide amorphe après lyophilisation.

30 16. Composition liquide selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que l'agent stabilisateur est choisi parmi :

- le polyvinylpyrrolidone (PVP), ou l'alcool polyvinylique (PVA), de préférence le

PVP, lorsque lesdites compositions présentent une structure majoritairement cristalline après lyophilisation,

- ou le saccharose, le tréhalose, le maltose ou le lactose, de préférence le saccharose, lorsque lesdites compositions présentent une structure solide amorphe après lyophilisation.

5

17. Composition liquide selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisée en ce que l'agent surfactant est choisi parmi le Tween 80, le Tween 20, le Triton X-100, ou le Brij 35, de préférence le Tween 80.

10

18. Composition liquide selon l'une des revendications 14 à 17, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution de Tris HCl (pH 7,8), ou de phosphate de potassium, de préférence une solution de Tris-HCl.

15

19. Composition liquide selon l'une des revendications 14 à 18, présentant une structure majoritairement cristalline à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 40 g/L de mannitol en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L de polyvinylpyrrolidone en tant qu'agent stabilisateur,
- 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

20

20. Composition liquide selon l'une des revendications 14 à 18, présentant une structure majoritairement cristalline à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 40 g/L de glycine en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L de polyvinylpyrrolidone en tant qu'agent stabilisateur,
- 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

25

21. Composition liquide selon l'une des revendications 14 à 18, présentant une structure solide amorphe à l'état sec après lyophilisation, et comprenant:

- 40 g/L de maltodextrine en tant qu'agent de charge,
- 10 g/L de saccharose en tant qu'agent stabilisateur,
- 0,2 g/L de Tween 80 en tant qu'agent surfactant,
- 10mM d'une solution de Tris HCl (pH 7,8).

30

22. Composition liquide selon l'une des revendications 14 à 21, caractérisée en ce qu'elle comprend une protéine déterminée choisie parmi les protéines d'intérêt

pharmaceutique, ou analytique, notamment des protéines d'environ 2000 à 3000 acides aminés (ou de masse molaire d'environ 300 kDa), représentant environ entre 3 $\mu\text{g/mL}$ et 10 $\mu\text{g/mL}$ (soit 0.0003% et 0.001%) de matière sèche dans la composition liquide.



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 662446
FR 0500791

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	EP 0 391 444 A (SYNTEX INC) 10 octobre 1990 (1990-10-10)	1-5, 9-12, 14-18,22	C07K1/14 C07B63/04 A61K9/19
Y	* le document en entier * * page 4; tableau 1 * * page 4, ligne 32-55 * * page 4, ligne 4-8 * * page 5, ligne 7 * * page 5, ligne 14-25,35-37 * * page 6, ligne 5 * * tableaux 2-5 * * revendications 14-16 *	6,19	
X	US 2004/002451 A1 (KERWIN BRUCE ET AL) 1 janvier 2004 (2004-01-01)	1-5, 9-12, 14-18,22	
Y	* le document en entier * * alinéas [0043] - [0045] *	6,19	
X	WO 00/48635 A (BESMAN, MARC; BJORNSON, ERIK; JAMEEL, FERAZ; KASHI, RAMESH; PIKAL, MIC) 24 août 2000 (2000-08-24)	1-5, 9-12, 14-18,22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Y	* le document en entier * * page 15, ligne 1-15 * * pages 20-21 * * page 24, ligne 5-11 * * tableaux 8-12 * * revendications 1,3,4,7 *	6,19	A61K
X	WO 99/30688 A (AUFFRET, ANTHONY) 24 juin 1999 (1999-06-24)	1-5, 9-12, 14-18,22	
Y	* le document en entier * * page 4, ligne 1 - page 5, ligne 14 * * revendications 20,22 *	6,19	
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 septembre 2005		Luangkhot, N	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

3
EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 662446
FR 0500791

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 01/39836 A (NATCO PHARMA LIMITED; VENKATESWARA RAO, PAVULURI; KHADGAPATHI, PODILI) 7 juin 2001 (2001-06-07)	1-5, 9-12, 14-18,22 6,19	
Y	* le document en entier * * exemples 2,4 * * pages 12,14 *		
X	US 4 343 897 A (NEUMANN ET AL) 10 août 1982 (1982-08-10)		
Y	* le document en entier * * exemple 6 *		
X	ZENG XIAN MING ET AL: "Effects of molecular weight of polyvinylpyrrolidone on the glass transition and crystallization of co-lyophilized sucrose" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (KIDLINGTON), vol. 218, no. 1-2, 7 mai 2001 (2001-05-07), pages 63-73, XP002344500 ISSN: 0378-5173 * le document en entier * * abrégé *	1-6, 9-12, 14-19,22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
X	WO 03/087327 A (MEDIMMUNE VACCINES, INC; VU, TRUONG-LE) 23 octobre 2003 (2003-10-23) * le document en entier * * alinéa [0116] *		1-6, 9-12, 14-19,22
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 septembre 2005		Luangkhot, N	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
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 intercalaire			

3
EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 662446
FR 0500791

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X,Y, D	CHANG B S ET AL: "Use of Subambient Thermal Analysis to Optimize Protein Lyophilization" CRYOBIOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, US, vol. 29, 1992, pages 632-656, XP002947696 ISSN: 0011-2240	1-6, 9-12, 14-19,22	
T	* le document en entier *	1-6, 9-12, 14-19,22	
	* abrégé *		
X,Y, D	----- CARPENTER JOHN F ET AL: "Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice." PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY. 2002, vol. 13, 2002, pages 109-133, XP009053337 ISSN: 1078-0467	1-6, 9-12, 14-19,22	
T	* le document en entier *	1-6, 9-12, 14-19,22	
X,Y, D	----- NAIL S L ET AL: "FUNDAMENTALS OF FREEZE-DRYING" PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, KLUWER, DORDRECHT, NL, vol. 14, 2002, pages 281-360, XP001181137 ISSN: 1078-0467	1-6, 9-12, 14-19,22	
T	* le document en entier *	1-6, 9-12, 14-19,22	
	----- -/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 septembre 2005		Luangkhot, N	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

3
EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 662446
FR 0500791

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
T	<p>PASSOT S ET AL: "Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 60, no. 3, août 2005 (2005-08), pages 335-348, XP004967315 ISSN: 0939-6411 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-6, 9-12, 14-19,22	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 septembre 2005		Luangkhot, N	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>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 intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35) 3

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0500791 FA 662446**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 14-09-2005

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0391444	A	10-10-1990	AU 631623 B2	03-12-1992
			AU 5301090 A	11-10-1990
			CA 2014103 A1	07-10-1990
			JP 3014520 A	23-01-1991
			NZ 233242 A	25-11-1992
			ZA 9002663 A	24-12-1991

US 2004002451	A1	01-01-2004	AU 2003245526 A1	06-01-2004
			CA 2490232 A1	31-12-2003
			WO 2004000211 A2	31-12-2003
			US 2003236196 A1	25-12-2003

WO 0048635	A	24-08-2000	AU 777972 B2	04-11-2004
			AU 2884300 A	04-09-2000
			BR 0008405 A	30-04-2002
			CA 2362927 A1	24-08-2000
			CN 1399560 A	26-02-2003
			CZ 20012996 A3	13-03-2002
			EP 1154796 A1	21-11-2001
			JP 2003520764 T	08-07-2003
			MX PA01008515 A	06-06-2003
			PL 356453 A1	28-06-2004
			US 6586573 B1	01-07-2003

WO 9930688	A	24-06-1999	AU 1570199 A	05-07-1999

WO 0139836	A	07-06-2001	AU 2023401 A	12-06-2001
			CA 2392810 A1	07-06-2001
			EP 1246668 A1	09-10-2002

US 4343897	A	10-08-1982	AR 219647 A1	29-08-1980
			AU 515131 B2	19-03-1981
			AU 5512580 A	29-01-1981
			CA 1139201 A1	11-01-1983
			CS 236458 B2	15-05-1985
			DD 148830 A5	10-06-1981
			DE 2904305 B1	14-08-1980
			DK 1380 A	06-08-1980
			EP 0014252 A1	20-08-1980
			ES 487676 A1	16-06-1980
			FI 800199 A	06-08-1980
			HU 181539 B	28-10-1983
			IE 49039 B1	10-07-1985
			IL 59132 A	31-10-1983
			JP 1167042 C	08-09-1983
			JP 55104900 A	11-08-1980

EPO FORM P0465

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

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0500791 FA 662446**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 14-09-2005

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4343897	A		JP 57028275 B	15-06-1982
			SU 1367867 A3	15-01-1988
			ZA 8000630 A	25-02-1981

WO 03087327	A	23-10-2003	AU 2003247337 A1	27-10-2003
			CA 2482448 A1	23-10-2003
			EP 1494651 A2	12-01-2005

US 2004248778	A1	09-12-2004	DE 10149030 A1	10-04-2003
			WO 03030866 A1	17-04-2003
			EP 1435914 A1	14-07-2004
			JP 2005511520 T	28-04-2005

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 662446
FR 0500791

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

1. revendications: 1-5,9-12,14-18,22 en entier, 6 et 19 en partie

Composition liquide et son utilisation comme solution pour lyophiliser des protéines, contenant du mannitol, du PVP et une solution TRIS HCl

2. revendications: 1-5,9-12,14-18,22 en entier, 7 et 20 en partie

Composition liquide et son utilisation comme solution pour lyophiliser des protéines, contenant de la glycine, du PVP et une solution TRIS HCl

3. revendications: revendications 1-5,9-12,14-18,22 en entier, 8 et 21 en partie

Composition liquide et son utilisation comme solution pour lyophiliser des protéines, contenant de la maltodextrine, du saccharose, du polysorbate 80 et une solution TRIS HCl

La première invention a été recherchée.

La présente demande ne satisfait pas aux dispositions de l'article L.612-4 du CPI car elle concerne une pluralité d'inventions qui ne sont pas liées entre elles en formant un seul concept inventif général.

Trois groupes d'inventions ont été distingués dans la présente la demande:

-1er groupe: revendications 1-5,9-12,14-18,22 en entier, 6 et 19 en partie

Composition liquide et son utilisation comme solution pour lyophiliser des protéines, contenant du mannitol, du PVP et une solution TRIS HCl

- 2ème groupe: revendications 1-5,9-12,14-18,22 en entier, 7 et 20 en partie

Composition liquide et son utilisation comme solution pour lyophiliser des protéines, contenant de la glycine, du PVP et une solution TRIS HCl

- 3ème groupe: revendications 1-5,9-12,14-18,22 en entier, 8 et 21 en partie

Composition liquide et son utilisation comme solution pour lyophiliser des protéines, contenant de la maltodextrine, du saccharose, du polysorbate 80 et une solution TRIS HCl

Le problème que se propose à résoudre la présente demande est de fournir une solution pour lyophiliser des protéines, caractérisée en ce qu'elle permet 1/ un procédé de lyophilisation utilisant une température opératoire de lyophilisation la plus haute possible (Tmax) afin de minimiser les coûts de production, 2/ un lyophilisat ayant une apparence

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 662446
FR 0500791

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

acceptable, une stabilité à long terme et une activité biologique (voir p.3 L.1-8).

La solution commune suggérée est de combiner les excipients, en considérant la température de transition vitreuse (Tg') et la température d'effondrement (Tcoll) comme critères de sélection (voir p.3 L.9-19), dans de proportions telles que la température d'effondrement de la composition ainsi obtenue est comprise entre -16°C et -10°C.

Une telle solution a déjà été décrite dans:

- D2 (voir 43-45, en particulier p.5 col.2 43 L.5-7: "...consumes less time and energy, and maintains product quality"), p.6 col.1 L.12-14: "it is necessary that the chosen excipients regardless of their Tg' values, protect the protein from possible degradation"),
- D3 (p.15 L.1-15), p.20-21, p.24 L.5-11, Tables 8-12, revendications 1,3,4,7) révèle par exemple une solution de 8% de mannitol, 2% de sucrose et 10mM Tris.HCl ayant un Tcoll de -10°C et permettant la formation d'un lyophilisat ayant une bonne apparence et stabilité
- D4 (p.4 L.1-p.5 L.14, revendications 20,22)

La solution proposée n'est donc pas nouvelle et/ou pas inventive. Comme le critère d'unité (qui stipule que le concept commun doit être nouveau ET inventif) n'est pas rempli et comme la présente demande propose des compositions liquides, c'est-à-dire des solutions distinctives, alors les trois inventions manquent donc de lien commun. Ainsi la présente demande manque d'unité.

Par ailleurs il convient de faire remarquer que la revendication 10 de procédé ne peut être reconnue nouvelle que si la présente composition ou son utilisation est elle-même nouvelle. Au cas où la revendication 10 est rendue nouvelle par les étapes de fabrication en elles-mêmes (congélation, dessiccation primaire etc...), alors cette revendication sera soumise à une objection de non-unité.

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 662446
FR 0500791

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:
1,10 et 14

Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches:
13

Raison pour la limitation de la recherche:

SEVERES OBJECTIONS DE CLARETE:

Les revendications 1,10 et 14 présentes ont trait à une très grande variété de composés ou de méthodes méthodes. Un fondement au sens de L'Article L.612-6 CPI et/ou un exposé au sens de l'Article L.612-5 CPI ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés ou méthodes revendiqué(e)s. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible.

En particulier, l'attention du demandeur est attirée sur le document D1 qui met en évidence que de telles expressions comme "agent de charge", "agent stabilisateur" n'ont pas de sens précis et ne peuvent servir comme caractéristique technique valable pour délimiter l'étendu de la protection. En effet le Tableau 1 de D1 (voir p.4) révèle que la même substance "mannitol" peut être dénommée tout à la fois "agent de charge", "agent de tonicité" ou "cryoprotectant". A la page 5 L.7, il est mentionné que le sucrose est utilisé pour ses propriétés "d'agent de charge", "d'agent de tonicité" et de "stabilisateur". En outre D4 (voir revendication 8) considère que le PVP, le sucrose et le lactose sont des "agents de charge", contrairement à la présente demande qui estime que ce sont des stabilisateurs. De ces faits les rapports en masse, ainsi que les concentrations et les dénominations de caractéristiques fonctionnelles, dans les revendications indépendantes ne peuvent en aucun cas faire l'objet d'une caractéristique technique essentielle qui pourra conférer la brevetabilité aux dites revendications. Par ailleurs, le type de structure obtenu "amorphe" ou "crystallin" ne peut être reconnu comme caractéristique technique vu que D1 enseigne que cela est le résultat de la combinaison de la nature et de la concentration des excipients utilisés (voir p.5 L.26-30).

Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés ou méthodes selon les revendications 2-4 et 15-18.

La revendication 13, visant un procédé de criblage, n'a pas été recherchée car elle contient des caractéristiques qui ne délimitent pas la portée de la protection, mais qui sont plutôt considérées comme une tentative de définir l'invention par le résultat recherché; notamment si elles consistent uniquement à revendiquer le problème technique

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 662446
FR 0500791

sous-jacent. En effet, ces caractéristiques ne sont rien d'autre que les objectifs que la présente demande et qu'un expert en la matière cherchent à atteindre.