

(51) International Patent Classification 5 : A61K 47/02	A1	(11) International publication number: WO 94/21298 (43) Date of international publication: September 29, 1994 (09/29.94)
(21) International application number: PCT/FR94/00296 (22) International filing date: March 17, 1994 (03.17.94) (30) Priority data: 93/03060 March 17, 1993 (03/17.93) FR (71) Applicant (for all Designated States except US): INSTITUTE PASIEUR [FR / FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR). (71)(72) Applicant and inventor: SIMPSON, Karl [FR / FR]; Hameau de Bobon, F-07610 Vion (FR). (72) Inventor; and (75) Inventor / Applicant (US only): CRAINIC, Radu [FR / FR]; 16, Pare de Diane, F-78350 Jouy-en-Josas (FR). (74) Agents: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc .; GrossetFournier & Demachy SARL, 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR).		(81) Designated states: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SL SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CL CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international research report.</i>
(54) Title: STABILISED PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREPARING SAME (54) Title: STABILIZED PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND THEIR PREPARATION PROCESSES (57) Abstract <p>A stabilized pharmaceutical composition containing one or more macromolecules selected from nucleic acids, lipids and carbohydrates, and / or one or more macromolecular complexes. The composition is characterized in that it includes one or more pharmaceutically acceptable carriers of which at least one contains heavy water D₂O. The composition is suitable for preparing vaccines.</p> (57) Abrege <p>The invention relates to a stabilized pharmaceutical composition comprising one or more macromolecule (s) selected from among nucleic acids, lipids or carbohydrates, and / or one or more macromolecular complex (s), characterized in that it comprises one or more pharmaceutically acceptable vehicle (s), at least one of these vehicles containing heavy water (D₂O). Application in the preparation of vaccines.</p>		

FOR INFORMATION ONLY

Codes used to identify States Parties to the PCT, on the cover pages of brochures publishing international applications under the PCT.

AT	Autricbe	GB	United Kingdom	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Niger
BE	Belgium	GR	Greece	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	HU	Hungary	NO	Norway
BG	Bulgaria	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BJ	Benign	IT	Italy	PL	Poland
BR	Brazil	JP	Japan	PT	Portugal
BY	Belarus	KE	Kenya	RO	Romania
CA	Canada	KG	Kirgbizistan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CB	Swiss	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenia
CI	Ivory Coast	LI	Liechtenstein	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxembourg	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LV	Latvia	TG	Togo
CZ	Czech republic	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DE	Germany	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	US	United States of America
FI	Finland	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

STABILIZED PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND THEIR PREPARATION METHODS

The present invention relates to stabilized pharmaceutical compositions and methods for their preparation.

The present invention relates more particularly to the stabilization of prophylactic, or therapeutic or diagnostic agents consisting of or containing macromolecules or macromolecular complexes.

The social and commercial importance of biological macromolecules is increasing.

Most therapeutic or protective agents act in the aqueous medium of the inter- or intracellular spaces, or the mucous surfaces.

Some act in the hydrophobic medium constituting the membrane, lipid phases or in the environment of hydrophobic amino acids.

In recent years, biotechnology has had considerable influence in the health care industries. The new processes for the manufacture and isolation of macromolecular materials are capable of producing, in commercial quantities, natural products or products of genetic engineering, endowed with specificities previously impracticable. (Viruses, DNA, RNA, ribozymes, anti-sense agents, etc.)

The old therapeutic compounds of relatively low molecular weights (aspirin, paracetamol, catecholamines, penicillin) have been characterized by a certain ease of formulation in tablets, emulsions, suspensions or solutions.

Certain macromolecules - such as nucleic acids, and their complexes with proteins (and their cofactors), complex carbohydrates, lipids - and their complexes, are becoming of increasing interest as vaccines, or therapeutics or diagnostic.

In aqueous media, all of the macromolecules and macromolecular complexes indicated above have a tendency to degrade, which limits their usefulness as a therapeutic, vaccinating or diagnostic agent.

For many agents, degradation is not a serious problem (for example, by following the manufacturer's instructions, problems associated with the use of an expired vaccine are avoided). However, even in the best of cases, the increase in service life from 50% to 100% (at the temperature of 20 ° C) of a therapeutic product, will be welcome (for example: the polio vaccine).

For other agents, storage in the form of lyophilized powder is entirely satisfactory, the degradation simply starting at the time of incorporation in an aqueous medium.

For many other agents, storage problems in dry form cannot be resolved. For some, stable in dry form, degradation in an aqueous medium is so rapid that stability presents a problem, even in the short period between incorporation in an aqueous medium and use.

There are several factors causing degradation: manufacturing processes, degradation enzymes (proteolytic enzymes, nucleases, lipases, glycolytic enzymes), oxidizing or reducing agents (such as oxygen, or organic or inorganic chemicals), microbial contamination.

Weak chemical bonds are important for biological macromolecules.

Thermal denaturation cannot be avoided, due to the many weak chemical bonds which characterize biological macromolecules. However, this can be limited, for example, by keeping the temperatures relatively low (refrigeration or freezing). Sometimes small increases in temperature can produce dramatic changes in the activity of biological agents. Such changes involve the breakdown of a molecular organization which depends on cooperative effects not associated with the specific denaturation of a specific protein or nucleic acid.

In order to remedy the destabilization phenomenon, adjuvants such as MgCl_2 , (for the polio vaccine), polyethylene glycol, etc. can be used; however, these can have the disadvantage of not always (depending on the concentrations) being physiologically appropriate.

For each ambient temperature, there is a spectrum of energy available for structural changes in a macromolecule or in a macromolecular complex (REF. Watson, James et al. Pages 126 to 162, Molecular Biology of the Gene, 4th Edition (1987) Publishers Benjamin Cummings, ISBN 0-8053-9612-8). In the worst case, these changes can be associated with the breakdown or creation of covalent chemical bonds. The less important energies may be sufficient for the creation or the rupture of secondary chemical bonds (the bonds hydrogen, hydrophobic interactions, Van-der-Waals interactions) which play an important role in biological processes and the activities of biological macromolecules. The importance of the bonds discussed below, is most pronounced between the temperatures of 0°C and 45°C , corresponding to the range of temperatures associated with living processes in higher organisms.

These weak interactions are all favored by a complementarity of physical structure. For example, a hormone and its attachment site are linked by several weak bonds. The structural complementarity increases the number of interactions of the Van-der-Waals type, hydrophobic or hydrogen, and thus avoids the disruptive effect of the ambient energy.

Water itself plays an important role in stabilizing macromolecules in an aqueous medium.

The hydrogen bonds between the water molecules order the structure. The structure can be highlighted with X-ray or neutron diffraction techniques.

At the periphery of the macromolecules, water molecules form a kind of layer, the depth of several water molecules. Like a cage, this layer, reinforced by hydrogen bonds - between

water molecules and between water molecules and macromolecules - has the effect of preserving the integrity of the content.

The electronic structure of water allows the free exchange of protons (nuclei of hydrogen atoms) between the elements of the water lattice and with favorable sites on macromolecules in aqueous medium.

In macromolecules, water molecules often serve as a structural component, creating rigid bridges between protein residues, nucleic bases, carbohydrates or polar components of lipids. The crystallographic studies clearly show the inclusion of water molecules in several macromolecular crystals. The cumulative cooperative effect of these molecular bridges in structures like picorna viruses is very sensitive to temperature increases.

Heavy water (or deuterium oxide, D_2O or 2H_2O) was discovered by Urey in 1932. This discovery precipitated an immediate interest, especially concerning the possible repercussions on the chemistry of life. During the years 1932-1939, more than 200 publications have shown the effects of heavy water on living organisms and their physiology and biochemistry. In all cases, D_2O was used to replace (between 5% and 100%) H_2O in the media aqueous, but the results obtained did not allow heavy water to be considered as a stabilizing agent.

During the 1970s and 80s, heavy water became an important tool in the field of biophysical studies, such as NMR (nuclear magnetic resistance) or the diffusion of monochromatic neutrons.

For NMR, the deuterium nucleus has the advantage of not having a nuclear spin. In H_2O medium, in a magnetic field, the radio frequency signals emitted by the excited nuclei cannot be detected, because all the hydrogens in the water create an enormous background noise. In the D_2O medium, water does not contribute to background noise, and the proton magnetic resonance

technique has become very powerful - especially for molecules which contain protons (^1H) and which are solubilized by D_2O .

The nuclear properties of H and D nuclei are very different. For a neutron beam, deuterium is relatively transparent, while ordinary water is relatively opaque (Stuhrman H. (1974) J. Appl. Cryst. 7, 173-187). The various techniques allow the differentiation of the structural information coming from the different macromolecules. Neutron crystallography has become a powerful tool.

That said, although it is known that heavy water brings an increase in the energy of hydrogen bonds by a factor of 0.24 kilocalories per mole, there was nothing to predict the influence of heavy water on stabilization. molecules solubilized by water, because phenomena other than the nature of the bond between the solvent and the molecule occur, these phenomena such as the cage effect, being to date poorly known. The cooperative effects of water / DNA / proteins within viruses also remain poorly understood to date. Confirmations can possibly be given by crystallographic studies (neutrons and X-rays).

One of the aims of the invention is to provide stabilized, physiologically compatible pharmaceutical compositions.

One of the aims of the invention is to provide a set of stabilized pharmaceutical compositions, in which the doses of pharmaceutical agents can be reduced compared to the same non-stabilized therapeutic compositions.

One of the other aspects of the invention is to propose a simple process for the preparation of a set of stabilized pharmaceutical, in particular therapeutic, vaccinating or diagnostic compositions.

These various aspects are obtained by the compositions of the invention. In this regard, the stabilized pharmaceutical composition of the invention, comprising one or more macromolecule (s) chosen from nucleic acids, lipids or carbohydrates and / or one or more macromolecular complex (s), is characterized in that it comprises one or more pharmaceutically acceptable vehicle (s), at least one of these vehicles containing heavy water (D₂O).

It has been found that the substitution of all or part of the hydrogen nuclei by deuterium nuclei in the water molecules which serve as solvent for a molecule or a macromolecular complex which constitutes the active substance of a pharmaceutical composition, made it possible to stabilize said pharmaceutical composition.

In nature, hydrogen is composed of 0.0156% deuterium. This can be purified by distillation or electrolysis of water, to obtain pure heavy water, which can then be electrolyzed to obtain pure deuterium.

The invention relates to the use of D₂O, or mixtures of D₂O and H₂O, as agents for stabilizing macromolecules chosen from nucleic acids, lipids or carbohydrates or macromolecular complexes in aqueous phase (solutions, suspensions or emulsions) .

In the context of this invention, it is the properties of deuterium oxide, or heavy water, which are particularly interesting. The H or D nuclei which exchange freely between water molecules and between the numerous sites of dissolved, suspended or emulsified biological macromolecules. D and H are freely exchangeable between labile hydrogen sites, for example all hydrogens in the body of water, or many hydrogens in biological macromolecules. Other hydrogens, sometimes hidden in the hydrophobic medium, are less accessible, but after a variable period, can also be exchanged.

In H₂O, D₂O or mixtures of the two, the physical properties of the solutions show a linear scaling of the physical properties (such as density or boiling point or molar values for the energy of hydrogen bonds).

The macromolecules and macromolecular complexes referred to in the invention are such that they have a molecular weight of at least 1500 Da, and advantageously greater than 5000 Da.

To fix the ideas, the stabilization of the macromolecules is such that for a given temperature, for example around 40 ° C., one can observe an increase in stability of the macromolecules or complexes macromolecular, preserved in a solution containing D₂O, compared to these same macromolecules or macromolecular complexes preserved in a solution containing H₂O.

For example, for the poliomyelitis viruses (see results), this stabilization results in an increase in the number of active viral particles by a factor of approximately 10³ to approximately 10⁴.

As indicated above, the macromolecules targeted in the invention are nucleic acids, carbohydrates or lipids.

As for the macromolecular complexes, they are advantageously chosen from protein-carbohydrate, protein-lipid, nucleic acid-carbohydrate, nucleic acid-lipid, nucleic acid-protein complexes, optionally complexed with carbohydrates and / or lipids, and from viruses .

By way of examples of biological macromolecules and macromolecular complexes capable of entering into the compositions of the invention appear:

1) nucleic acids: DNA, for applications in vivo (for example: gene therapy) and in vitro (for example: diagnostic applications); RNA, ribozymes for in vivo applications (modifications of nucleic acids or nucleic acid / protein complexes); DNA and RNA are part of the genomes of

viruses used as vectors in therapy or vaccinology; natural or artificial DNA / RNA complexes; the nucleic acids used can be those existing in natural or artificial forms (created by genetic engineering);

2) carbohydrates: these macromolecules have not yet found applications as independent therapeutics, but in their complexes with proteins, they are recognized as a major factor in modifying the activities of these proteins; the different carbohydrate forms can invoke significant physiological activities (as is the case for tPA, where the different "glycoforms" have very different activities);

3) lipids: lipid macromolecules play important roles in cell membranes, but apart from relatively small molecules like prostaglandins and group A vitamins, these agents have not found many therapeutic applications; their interest lies in their macromolecular complexes and in particular in their uses in liposomes used as delivery systems for other therapeutic agents;

4) macromolecular complexes: the most typical are nucleic acid and protein complexes, or proteins and carbohydrates; a virus is a macromolecular complex optionally composed of nucleic acids, proteins, carbohydrates and lipids (for example, the influenza virus or the H1N1 virus); there may also be mentioned artificial complexes, such as a lipid layer coating a therapeutic agent, targeted by activities localized in the lipid layer, having a specificity of binding with components of the targeted target.

The pharmaceutical compositions involved in the present invention can be defined by:

A - either one or more macromolecule (s) and / or one or more macromolecular complex (s), maintained in one or more pharmaceutically acceptable vehicle (s),

B - either one or more macromolecule (s), and one or more macromolecular complex (s), maintained separately with respect to one or more pharmaceutically acceptable vehicle (s), the

macromolecule (s) , the macromolecular complex (s) and the pharmaceutically acceptable vehicle (s) being intended to be combined for administration to a patient,

C - either at least two elements, kept separately from each other, and each comprising one or more macromolecule (s) and / or one or more macromolecular complex (s), at least one of these elements being in the presence of a pharmaceutically acceptable vehicle containing heavy water, these various elements being intended to be combined for administration to a patient,

D - or at least two of the pharmaceutical compositions according to one of the variants A, B or C, kept separately from one another and intended to be combined for administration to a patient.

By way of example, a composition corresponding to the combination for the administration of the variants according to B and C to a patient comprises the following characteristics:

- on the one hand one or more macromolecule (s) and / or one or more macromolecular complex (s) are maintained separately with respect to one or more pharmaceutically acceptable vehicle (s), and on the other hand at least two elements are kept separate from each other, and each comprise one or more macromolecule (s) and / or one or more macromolecular complex (s), at least one of these elements being in the presence of a pharmaceutically acceptable vehicle containing heavy water, the macromolecule (s), the macromolecular complex (s), the pharmaceutically acceptable vehicle (s) and the above elements being intended to be collected for administration to a patient.

The macromolecules and / or the macromolecular complexes may or may not be stored with the pharmaceutically acceptable vehicle containing heavy water.

According to an advantageous embodiment of the invention, the compositions are such that the macromolecules or the macromolecular complexes are either in suspension, or in solution, or in emulsion in the pharmaceutical vehicle.

According to another advantageous embodiment of the invention, the compositions are such that the macromolecule (s) and / or the macromolecular complex (s) and the pharmaceutically acceptable vehicle are maintained separately and are intended for be collected for administration to a patient.

By way of example, the macromolecules and / or the macromolecular complexes can be lyophilized and mixed with the pharmaceutically acceptable vehicle shortly before administration to a patient, or at the time of this administration.

According to another advantageous embodiment, in the compositions of the invention the volume of the pharmaceutical vehicle varies from approximately 0.1 ml to approximately 20 ml, in particular from approximately 0.1 ml to approximately 5 ml, and the quantity of macromolecule or macromolecular complex varies from about 1µg to about 3g.

According to an advantageous embodiment for a unit dose, the amount of macromolecule or macromolecular complex is approximately 10 µg for a volume of approximately 1 ml of pharmaceutical vehicle.

According to yet another embodiment, in the compositions of the invention, the pharmaceutical vehicle is a mixture of H₂O-D₂O and the weight ratio between D₂O and H₂O varies from approximately 10% to approximately 100%, advantageously approximately 40 % to about 95%, and preferably about 80% to about 95%.

In general, D₂O H₂O mixtures, containing high concentrations of D₂O (90-100%), give stabilization equivalent to a reduction of ambient temperature by a factor of 4-5 ° C (i.e. in 95%

of D₂O at 25 ° C - for example - a macromolecule undergoes a degradation effect which is equivalent to that normally observed in H₂O at 20 ° C).

In addition, the high concentrations of D₂O offer significant protection against the consequences of microbial contamination. Few microbes tolerate D₂O concentrations above 70%. Heavy water is effectively a self-sterilizing medium (note that certain microbes, generally non-pathogenic, can be adapted to life in D₂O medium).

The compositions of the invention are non-toxic. Indeed, it is known that D₂O at a concentration of less than 10% of body water has no significant toxic effect. (See A. Barbour, HG, (1937), Yale J. Biol. Med. 9, 551 - B: Barbour, HG, (1938), Am. J. Cancer, 32, 440- C: Barbour, HG (1938), J. Pharm. Exp. Therap., 62, 158 - D: Barbour, HG, (1936), J. Pharm. Exp. Rherap., 58, 460).

Pharmaceutical agents likely to benefit from these stabilizing effects are often expensive and contained in small volumes (oral vaccine, for example 0.15 ml); thus the relatively high price of D₂O is less important.

As D₂O and H₂O are fully miscible, and as the labile hydrogen atoms (1 et and 2 H) are exchanged quickly, we can see that a dose of D₂O containing a protective or therapeutic agent will be quickly dispersed in the mass body water. With a natural abundance of 0.0156% of hydrogen atoms, the mass of deuterium in a person weighing 75kg will be about 1g, equivalent to 10g of heavy water. The administration of small doses (for example: 0.1 to 5.0 ml) will not exceed the amount of heavy water already present in the body of an adult. Even very high doses (10 ml to 50 ml) do not contribute to a level of deuterium (approximately 0.1%) approaching toxic concentrations (10% - 20%) or fatal (25% and more).

Heavy water does not accumulate in the body and it is released into the urine, perspiration and respiration, just like water.

In summary, the experiments and observations discussed demonstrate that there is a stabilizing effect for macromolecules and their complexes, of around 5 ° C, associated with heavy water. Despite the relatively small temperature changes, which are in the range of 2 ° C to 5 ° C, the cooperative effects mentioned above can contribute to a significant increase in stability. Macromolecules and even living organisms (certain microbes, generally non-pathogenic, which can be adapted to life in medium D₂O) showed resistance to temperatures normally associated (in H₂O medium) to thermal denaturation. Certain complexes have shown a reversible resistance to disintegration induced by solutions of low ionic strength (in H₂O, for example less than KC1 1mM).

In the compositions of the invention, the pharmaceutical vehicle can contain a stabilizing adjuvant, advantageously MgCl₂, of carboxymethyl cellulose, polyethylene glycol, carbohydrate molecules, such as glycerol, glucose, sucrose, (and other C₆ sugars), pentose sugars and their polymers (starches for example), these carbohydrate molecules which can be complexed with polyethylene glycol, polyethylene glycol advantageously having a molecular weight of approximately 500 to approximately 5000 daltons, and in particular approximately from 1000 to approximately 5000 daltons .

In clinical application, D₂O (and its mixtures) can also be used with regulators of tone, pH, viscosity and other stabilizing agents such as those indicated above.

In the compositions of the invention, the weight ratio between the stabilization aid and the pharmaceutical vehicle is such that the pharmaceutical vehicle does not have a viscosity greater than about 0.2 Pascal-seconds (20 centipoise).

In the compositions of the invention the weight ratio between the stabilization adjuvant and the pharmaceutical vehicle is less than about 30%, and is advantageously from about 1% to about 30%, and more preferably about 10% at around 30%.

In the compositions of the invention, the macromolecular complexes and the macromolecules are those used:

- in vaccinating compositions, such as those against polio, against measles, against hepatitis, in particular hepatitis B or C, against influenza, against the virus of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS virus also designated by HIV = human immunodeficiency virus), against diphtheria, against tetanus, against whooping cough or against a combination of at least two of the above pathologies, (for example the vaccine against diphtheria, tetanus and polio [DTP], or vaccine against diphtheria, tetanus, polio and whooping cough, marketed under the brand TETRACOQ,

- as a diagnostic agent, in particular for the diagnosis of measles, meningitis or HIV or,
- as a therapeutic agent, such as nucleic acids or ribozymes. The invention also relates to a process for preparing a pharmaceutical composition of the invention, characterized in that it comprises the following steps:

- either the dilution using D₂O in an appropriate amount, of the above pharmaceutical composition which is in the form of an aqueous solution, previously concentrated, for example at a rate of 20 mg / ml,

- and / or dialysis, against D₂O in an appropriate amount, of the above pharmaceutical composition which is in the form of an aqueous solution,

- Or the resuspension of the above pharmaceutical composition, in the form of a solid, using D₂O, in an amount sufficient to obtain the appropriate concentration of the pharmaceutical composition.

Dialysis is advantageously used in the case where the pharmaceutical composition contains a fragile active substance, poorly resistant to other physical treatments.

The invention also relates to a process for the manufacture of a stabilized preparation of viral origin, containing macromolecular complexes, characterized in that said macromolecular complexes are placed in solution, suspension or emulsion in a medium containing heavy water.

By preparation of viral origin means in particular

- complete, inactivated or attenuated viruses,
- viral glycoprotein proteins, whether surface or internal and whether they are obtained from virus or by known genetic recombination, for example the surface protein of hepatitis B virus,
- viral vectors, such as adenoviruses, poxviruses such as canary pox, or vaccinia virus expressing proteins of viral or bacterial origin (see for example the European patent: EP 083 286),
- the nucleic acids (RNA or DNA), encapsulated or not, known for example under the name of "naked DNA" by the European patent application EP 465 529 (WO 90/11092), or the American patent USP 4 394 448, which describes the encapsulation of DNA or DNA fragments in lipid vesicles.

The invention also relates to a method for stabilizing a vaccine preparation of viral origin, in particular of a viral suspension, characterized in that it comprises a stage of incorporation of heavy water:

- either to the virus or to the cells to be infected, before contact between the cells to be infected and the virus,

- either in the culture medium of cells infected with the virus, - either in the vaccine preparation obtained at the end of the previous step.

Heavy water can be added at any stage involved in the process for preparing the viral suspension, preferably after recovery of the viral particles, at the end of the stage of culturing cells infected with the virus.

In the case of a vaccine prepared in lyophilized form, heavy water can be used for the preparation of the viral suspension, before lyophilization and / or for the rehydration of the above lyophilized vaccine. Heavy water is preferably used at the rehydration stage.

The vaccines to which the invention advantageously applies are the following: influenza, chickenpox, measles, mumps, rubella, dengue, HIV, herpes.

The examples cited below are purely illustrative, and should not be interpreted as limiting the scope of this invention.

They demonstrate:

1: - thermostabilization of an important vaccine;

2: - the stabilization of a model macromolecular complex, illustrating the reversibility of the thermostabilization effects due to D₂O and its associated isotope effects.

These examples can be applied to the following cases: to a ribozyme, to the recombinant hepatitis B and C vaccine, to the influenza vaccine, to the measles vaccine, to the DTP vaccine (diphtheria, tetanus, poliomyelitis), to the vaccine tetanus, to the kit for the diagnosis of HIV.

It should be noted that in the above and what follows, all of the cited literature documents are incorporated by reference.

Descriptions of the figures:

FIG. 1 represents the thermostability, at 37 ° C., of a pharmaceutical composition according to the invention.

The abscissa axis corresponds to time (expressed in days) and the ordinate axis corresponds to the logarithm of the concentration of viral particles (expressed in DICC_{50} / ml unit, DICC_{50} being the cytotoxic infectious dose in the cell). The curve represented by diamonds corresponds to a pharmaceutical composition in aqueous solution; the curve represented by squares corresponds to a pharmaceutical composition in aqueous solution, containing MgCl_2 (in an amount of 1M) as an adjuvant; the curve represented by triangles corresponds to a pharmaceutical composition of the invention, dissolved in 95% heavy water; the curve represented by crosses corresponds to a pharmaceutical composition of the invention, dissolved in D_2O and containing MgCl_2 (in an amount of 1M) as an adjuvant.

FIG. 2 represents the thermostability at 42 ° C of a pharmaceutical composition according to the invention.

The abscissa axis corresponds to time (expressed in days) and the ordinate axis corresponds to the logarithm of the concentration of viral particles (expressed in DICC_{50} unit () / ml).

The curve represented by diamonds corresponds to a pharmaceutical composition in aqueous solution; the curve represented by squares corresponds to a pharmaceutical composition in aqueous solution, containing MgCl_2 (in an amount of 1M) as an adjuvant; the curve represented by triangles corresponds to a pharmaceutical composition of the invention, dissolved in 95% heavy water; the curve represented by crosses corresponds to a pharmaceutical

composition of the invention, dissolved in D₂O and containing MgCl₂ (in an amount of 1M) as an adjuvant.

FIG. 3 represents the thermostability at 45 ° C. of a pharmaceutical composition according to the invention.

The abscissa axis corresponds to time (expressed in days) and the ordinate axis corresponds to the logarithm of the concentration of viral particles (expressed in DICC₅₀ / ml unit).

The curve represented by diamonds corresponds to a pharmaceutical composition in aqueous solution; the curve represented by squares corresponds to a pharmaceutical composition in aqueous solution, containing MgCl₂ (in an amount of 1M) as an adjuvant; the curve represented by triangles corresponds to a pharmaceutical composition of the invention, dissolved in 95% heavy water; the curve represented by crosses corresponds to a pharmaceutical composition of the invention, dissolved in D₂O and containing MgCl₂ (in an amount of 1M) as an adjuvant.

FIG. 4 represents the thermal inactivation of the Sabin type 3 poliovirus. The initial concentration of the virus is fixed at 5×10^6 DICC₅₀ / 50 µl. (DICC₅₀ = cytotoxic infectious dose in the cell).

Suspensions of the Sabin virus type 3 of equal titers (5×10^6 DICC₅₀ / 50 µl) are prepared in the following media: a) Dulbecco-MEM in normal water (corresponding to the abbreviation "medium H" on the face);

b) Dulbecco-MEM in D₂O with a final concentration of 87% (corresponding to the abbreviation "medium D" in the figure);

c) 1M MgCl₂ in H₂O, Tris buffered at pH 7.2 (corresponding to the abbreviation "H-Mg medium" in the figure); and

d) 1M MgCl₂ in D₂O with a final concentration of 87%, Tris buffered at pH 7.2 (corresponding to the abbreviation "D-Mg medium" in the figure).

After 3 days of incubation (part A of figure 4) and after 7 days of incubation (part B of figure 4) at 4 ° C, 37 ° C, 42 ° C and 45 ° C, the type of virus is determined. The results are expressed as log difference of DICC₅₀ / 50µl between the initial titer of the virus maintained at -30 ° C and the titer of each sample. The mean and standard error are shown for each result.

FIG. 5 represents the thermal inactivation of the Sabin-type poliovirus 1 in the presence of D₂O and / or MgCl₂ (see details in Figure 4). Part A of Figure 5 corresponds to 3 days of incubation, and Part B of Figure 5 corresponds to 7 days of incubation.

FIG. 6 represents the thermal inactivation of the Sabin-type poliovirus 2 in the presence of D₂O and / or MgCl₂ (see details in Figure 4). Part A of Figure 6 corresponds to 3 days of incubation, and Part B of Figure 6 corresponds to 7 days of incubation.

FIG. 7 represents the stabilization of the Sabin type 3 poliovirus, with various concentrations of heavy water and of MgCl₂. The same experimental conditions as those described in FIG. 4 are combined, except for the concentration of D₂O (part A of FIG. 7) or MgCl₂ (part B of FIG. 7).

The results are expressed as the difference between the initial titer of the viral suspension stored at -30 ° C (log of DICC₅₀ / 50µl) and the titer of each of the samples after 3 days of incubation at 45 ° C. The initial virus titer of 5x10⁶ TCID₅₀/50 .µl.

FIG. 8 represents the presence or absence of sedimentation of PNN (nucleosome nucleus), according to the ionic strength of the water, and according to the presence or not of heavy water.

The PNN was sedimented at pH 7.75 (in the middle of D₂O, pH 8.15 according to the glass electrode) 0.2 mM EDTA, at an ionic strength according to Table 1 below. All sedimentation is carried out in the CENTRISCAN MSE, an analytical ultracentrifuge, in the rotor comprising 6 measuring cells at 50,000 rpm. Parts A to C correspond to a measurement interval of 6 minutes, parts D to G correspond to a measurement interval of 8 minutes, wavelength: 254nm; sample concentration: 0.5 to 1.0 mg / ml.

The abscissa axis corresponds to the measurement radius and the ordinate axis to the DNA concentration. This figure demonstrates that heavy water consolidates PNN particles as much as ionic strength.

EXAMPLE 1-

Thermostabilization of poliovirus with heavy water

The immunogenicity of the attenuated viruses in the Sabin polio vaccine depends on their degree of infection at the time of administration. The levels of taking the oral polio vaccine (OPV) are linked to the dose of each of the three viral strains 1, 2 and 3, making up the vaccine. One explanation for the fairly low catch levels in some Third World countries may be the breaks in the cold chain before the administration of the vaccine. Sabin vaccine strain 3 is very critical because of its relatively poor immunogenicity and thermostability.

The World Health Organization (WHO) currently requests that OPV be stabilized by the addition of MgCl₂ (concentration 1 M) in the vaccine. Far from being the ideal solution (loss of less than 0.5 log of activity after seven days at 45 ° C), this method is currently the best

compromise. It is demonstrated here that according to the invention, 95% heavy water offers, even without any other adjuvant, stabilization equivalent or superior to that offered by MgCl_2 , by following the entirely standard methods (apart, of course, the using heavy water).

Experimental objectives

All references to heavy water (D_2O), in the examples below, refer to 95% heavy water.

1 Determination and quantification of the effects of D_2O on the stabilization of the Sabin vaccine.

2 Comparison of the thermostabilization effects of: (a) D_2O and (b) D_2O supplemented with MgCl_2 .

The type 3 strain is responsible for most of the problems associated with the Sabin vaccine. For this reason, this virus has been the target of preliminary studies.

Global context of the polio vaccine study.

In humans, the immunogenicity of OPV is associated with the infectious nature of the viral suspension. The potential for OPV to degrade in regions with high ambient temperatures is a problem (see above). For WHO, the goal of eliminating polio before the year 2000 depends in part on improving the stabilization processes of current vaccines (especially for developing countries).

The following results show that strain 3 of the Sabin vaccine benefits from very marked stabilization in heavy water at 95% (the other conditions being similar to those used with water), without any other stabilizing agent. The effect of D_2O is slightly greater than the best of current solutions (MgCl_2 , 1M)

Experimental methods

The Sabin 3 strain is chosen as a model. The virus culture is carried out according to conventional methods.

The addition of heavy water is carried out by resuspending the virus pellet (sedimented in an ultracentrifuge according to standard conditions) in D₂O (19 volumes) and a PBS buffer (phosphate buffered saline) 20 times concentrated (1 volume). Ultracentrifugation is without significant discomfort for viruses. The comparative studies are made with standard media (H₂O, H₂O / MgCl₂ and MgCl₂ + D₂O).

The concentration of the virus is adjusted to approximately 10 0 units / ml in 95% D₂O.

Viruses are subjected to different thermal conditions according to the curves shown below.

Virus - titration

For all samples, serial dilutions are made (MEM Eagles with Earle salts, 4% FCS, 3% sodium bicarbonate, penicillin, streptomycin). A suspension of Hep2C cells is added and the whole is incubated at 35 ° C for 5 to 7 days. The plates are stained with "naphthalene black" to assess the viability of the cells. The titles are then calculated. Each experiment includes controls.

The results below relate to the measurement of the stability of the compositions of the invention at the following three temperatures:

37 ° C,
42 ° C,
45 ° C.

RESULTS, Days at 37 ° C Log of viral units, average of three samples

Days	H ₂ O	MgCl ₂	D ₂ O	MgCl ₂ /D ₂ O
0	10	10	10	10
2	8.6	9.5	9.6	9.6
5	7.8	8.1	8.1	8.2

7 6.8 7.5 7.7 7.8

RESULTS, Days at 42 ° C Log of viral units, average of three samples Days H₂O MgCl₂ D₂O
MgCl₂/D₂O

Days	H ₂ O	MgCl ₂	D ₂ O	MgCl ₂ /D ₂ O
0	10	10	10	10
2	5.4	8.8	9.4	9.3
5	3.4	5.4	6.0	6.2
7	2.8	5.2	5.5	5.4

RESULTS, Days at 45 ° C Log of viral units, average of three samples

Days	H ₂ O	MgCl ₂	D ₂ O	MgCl ₂ /D ₂ O
0	10	10	10	10
2	4.6	7.8	8.5	8.7
5	1.8	4.8	5.8	6.5
7	0.4	4.7	4.7	4.9

EXAMPLE 2

Stabilization of the architecture of the nucleosome by D₂O

The nucleus of the nucleosome (PNN) is made up of four pairs of protein molecules, the histones H2a H2b, H3 and H4. Each protein octamer is surrounded by 144 base pairs of DNA, completing 1.75 superhelical turns (Noll M. (1974) Nature 251, 249-251; Kornberg RD (1974) Science 184, 868-871; Finch J. et al. (1977) Nature 269, 29-35). Gordon studied the effect of ionic strength (in H₂O medium) on the sedimentation properties of PNN (Gordon V.C. et al. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci (USA). 75, 660-663). The example below illustrates the important differences between the stabilization properties of plain and heavy water towards PNN. PNN can be considered as a kind of model system of the family of nucleic acid / protein complexes.

Experimental methods

The sedimentation of PNNs prepared from chicken erythrocytes (Suau P. et al (1977) Nue. Acids. Res. 4, 3769-3786) is studied with the analytical ultracentrifuge (MSE CENTRISCAN) under several force conditions ionic and heavy water concentrations. Several

samples of H₂O are after re-equilibrated in heavy water by dialyzing against a large volume of heavy water, at various concentrations and ionic compositions. All the solutions are buffered with 0.2 mM EDTA, pH 7.75 (in D₂O adjusted to pH 8.15 according to the glass electrode). The ionic strength was provided by KCl.

Results

The sedimentation of PNNs is dependent on the ionic composition of the water. Very obvious is the disintegration of PNNs in low H₂O medium ion power (Fig 4A). In heavy water, this degradation of PNNs does not appear (Fig 4D). Even the ionic dependence of the sedimentation value (in Svedburg units - s) becomes very limited (See Table 2 and Fig 4). The disaggregated PNN (4A), after dialysis against heavy water, becomes again a discrete particle with a characteristic sedimentation for a PNN.

In all the studies, the PNNs adopted - in D₂O medium - the most compact form observed in H₂O media (after normalization of the sedimentation values to correct the differences in density and viscosity of heavy water and its mixtures) .

In the additional data, not presented here, it is observed that the stabilization at low ionic strength is manifest from approximately 40% of D₂O.

TABLE 1

Sample	[KCl] mM	Solvent	Value s	radius of the first measurement (see index) mm
A	0	H ₂ O	-	63.15
B	5	-	10.2	63.15
C	25	-	11.2	65.43
D	0	D ₂ O	11.0*	63.29
E	25	-	11.2*	63.44
F- Redialysed	0	-	11.0*	63.00
G- C redialysed	0	-	11.1*	63.22

values corrected according to viscosity and density of D₂O.

EXAMPLE 3 Stabilization of the Poliovirus Vaccine

This stabilization is carried out under the conditions described in Figures 4 to 7.

The results shown in Figures 4 to 7 demonstrate the stabilizing effect of heavy water.

When the polioviruses (Sabin type 1, 2 and 3) are prepared according to industrial procedures (dilution of a primary viral suspension: clarified supernatant from cultures of infected cells) by replacing the solutions of water with solutions containing D₂O, the final concentration of which is around 90%, the results obtained are more striking than those obtained with the resuspended viruses after centrifugation (see figs. 1-3).

Example 4: Stabilization of the poliovirus vaccine in different solutions containing heavy water.

The addition of D₂O takes place during the preparation of the mixture of three monovalent vaccines (Sabin type 1, type 2, type 3) prepared in aqueous solution. The final D₂O concentration is 80%.

The test covers the following formulas:

1. Mixture of albumin-MgCl₂ in aqueous solution
2. Albumin-MgCl₂ mixture in solution containing D₂O
3. Amino acid-MgCl₂ mixture in solution containing D₂O
4. Amino acid-sucrose mixture in solution containing D₂O

Global Title (DICC50/dose)							
Testing	70°C	7j 37°C	loss (in log)	5j 45°C	loss (in log)	7j 45°C	loss (in log)
1 witness alb.	6,63	5,48	1,15	3,47	3,16	3,20	3,43
2 alb. D ₂ O	6,57	5,90	0,67	4,67	1,90	4,13	2,44

3 A.A. DO	6,70	5,95	0,75	4,53	2,17	4,10	2,60
4 Sacch. D ₂ O	6,41	5,34	1,07	4,04	2,37	3,44	2,97

EXAMPLE 5 Stabilization of the Varicella Vaccine

Varicella virus is a fragile virus.

The usual stabilizing solution of the Varicella vaccine was prepared in aqueous solution and in solution containing heavy water (D₂O), at a concentration of 80%. A virus harvest was diluted in the same proportions with each of the stabilizers and lyophilized. The lyophilized products were rehydrated in their respective solvent.

	Titles (PFU / dose) after rehydration 2h at 37°C
H ₂ O	Loss = 0.69 log
D ₂ O	Loss = 0.37 log

PFU = unit leading to the formation of plaque.

CLAIMS

1. Stabilized pharmaceutical composition comprising one or more macromolecule (s) chosen from nucleic acids, lipids or carbohydrates, and / or one or more macromolecular complex (s), characterized in that it comprises one or more pharmaceutically acceptable vehicle (s), at least one of these vehicles containing heavy water (D_2O).
2. Composition according to claim 1, in which the macromolecular complexes are chosen from protein-carbohydrate, protein-lipid, nucleic acid-carbohydrate, nucleic acid-lipid, nucleic acid-protein complexes, optionally complexed with carbohydrates and / or lipids, and among viruses.
3. Composition according to any one of the preceding claims, characterized in that the macromolecules or the macromolecular complexes are either in suspension, or in solution, or in emulsion in the pharmaceutically acceptable vehicle.
4. Composition according to claim 1 or 2, characterized in that the macromolecule (s) and / or the macromolecular complex (s) and the pharmaceutically acceptable vehicle are maintained separately and are intended to be combined in view of the administration.
5. Composition according to any one of claims 1 to 4, characterized in that the volume of the pharmaceutical vehicle varies from approximately 0.1 ml to approximately 20 ml, in particular from approximately 0.1 ml to approximately 5 ml, and the amount of macromolecule or macromolecular complex varies from about $1\mu g$ to about 3g.
6. Composition according to any one of the preceding claims, characterized in that the pharmaceutical vehicle is a mixture of H_2O - D_2O and in that the weight ratio between D_2O and H_2O varies from approximately 10% to approximately 100%, advantageously d about 40% to about 95%, and preferably about 80% to about 95%.

7. Composition according to any one of the preceding claims, characterized in that the pharmaceutical vehicle contains a stabilization adjuvant, advantageously MgCl_2 of carboxymethyl cellulose, polyethylene glycol, carbohydrate molecules, such as glycerol, glucose, sucrose (and others C6 sugars), pentoses and their polymers, these carbohydrate molecules which can be complexed with polyethylene glycol, polyethylene glycol advantageously having a molecular weight of approximately 500 to approximately 5000 daltons, and in particular approximately from 1000 to approximately 5000 daltons.

8. Composition according to claim 7, characterized in that the weight ratio between the stabilization adjuvant and the pharmaceutical vehicle is such that the pharmaceutical vehicle does not have a viscosity greater than about 0.2 Pascal-seconds (20 centipoises) .

9. Composition according to claim 8, characterized in that the weight ratio between the stabilization adjuvant and the pharmaceutical vehicle is less than about 30%, and is advantageously from about 10% to about 30%.

10. Composition according to any one of claims 1 to 9, characterized in that the macromolecular complexes and the macromolecules are those used:

- in vaccine compositions, such as those against the flu, against polio, against measles, against chickenpox, against mumps, against rubella, against dengue, against hepatitis, in particular hepatitis B or C, against the acquired immunodeficiency syndrome virus (AIDS virus), against diphtheria, against tetanus, against whooping cough or against a combination of at least two of the above-mentioned pathologies, or
- as a diagnostic agent, such as for the diagnosis of measles, meningitis or HIV or,
- as a therapeutic agent, such as proteins, factor VIII, polyclonal or monoclonal antibodies, hormones, nucleic acids or ribozymes.

11. A method of preparing a pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 10, characterized in that it comprises the following steps: either the dilution with D₂O of the above pharmaceutical composition which is in the form of a previously concentrated aqueous solution, for example at a rate of 20 mg / ml,

- And / or dialysis against D₂O of the above pharmaceutical composition in the form of an aqueous solution,

- Or the resuspension of the above pharmaceutical composition in the form of a solid, using D₂O in an amount sufficient to obtain the appropriate concentration of the pharmaceutical composition.

12. Method for preparing a stabilized composition containing macromolecular complexes of viral origin, characterized in that said macromolecular complexes are dissolved, suspension or emulsion in a medium containing heavy water.

13. Method for stabilizing a preparation of viral origin, optionally vaccinating, in particular of a viral suspension, characterized in that it comprises a stage of incorporation of heavy water:

- either to the virus or to the cells to be infected before contact between the cells to be infected and the virus,

- either in the culture medium of cells infected with the virus,

- either in the vaccine preparation obtained at the end of the previous step.

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 47/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/21298 (43) Date de publication internationale: 29 septembre 1994 (29.09.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00296 (22) Date de dépôt international: 17 mars 1994 (17.03.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/03060 17 mars 1993 (17.03.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (71)(72) Déposant et inventeur: SIMPSON, Karl [FR/FR]; Hameau de Bobon, F-07610 Vion (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): CRAINIC, Radu [FR/FR]; 16, parc de Diane, F-78350 Jouy-en-Josas (FR). (74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.; Grosset-Fournier & Demachy SARL, 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: STABILISED PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND METHODS FOR PREPARING SAME (54) Titre: COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES STABILISEES ET LEURS PROCEDES DE PREPARATION (57) Abstract <p>A stabilised pharmaceutical composition containing one or more macromolecules selected from nucleic acids, lipids and carbohydrates, and/or one or more macromolecular complexes. The composition is characterized in that it includes one or more pharmaceutically acceptable carriers of which at least one contains heavy water (D₂O). The composition is suitable for preparing vaccines.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne une composition pharmaceutique stabilisée comprenant une ou plusieurs macromolécule(s) choisie(s) parmi les acides nucléiques, les lipides ou les glucides, et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), l'un au moins de ces véhicules contenant de l'eau lourde (D₂O). Application à la préparation de vaccins.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES STABILISEES ET LEURS PROCEDES DE PREPARATION

La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques stabilisées et leurs procédés de préparation.

La présente invention concerne plus particulièrement la stabilisation d'agents prophylactiques, ou thérapeutiques ou de diagnostic constitués ou contenant des macromolécules ou des complexes macromoléculaires.

L'importance sociale et commerciale des macromolécules biologiques augmente.

La plupart des agents thérapeutiques ou protecteurs agissent dans le milieu aqueux des espaces inter- ou intracellulaires, ou les surfaces muqueuses.

Certains agissent dans le milieu hydrophobique constituant les phases membranaires, lipidiques ou dans l'environnement des acides aminés hydrophobes.

Au cours de ces dernières années, les biotechnologies ont eu des influences considérables dans les industries du secteur de la santé. Les nouveaux procédés pour la fabrication et l'isolement de matériaux macromoléculaires sont capables de réaliser, en quantités commerciales, des produits naturels ou issus du génie génétique, dotés de spécificités précédemment irréalisables. (Virus, ADN, ARN, ribozymes, agents anti-sens, etc...)

Les anciens composés thérapeutiques de poids moléculaires relativement faibles (aspirine, paracétamol, catécholamines, pénicilline) ont été caractérisés par une certaine facilité de formulation dans les comprimés, les émulsions, suspensions ou solutions.

Certaines macromolécules - telles que les acides nucléiques, et leurs complexes avec les protéines (et leurs cofacteurs), les glucides complexes, les lipides - et leurs complexes, deviennent d'un intérêt de plus en plus important en tant que vaccins, ou thérapeutiques ou de diagnostic.

Dans les milieux aqueux, toutes les macromolécules et les complexes macromoléculaires indiqués ci-dessus ont une tendance à la dégradation, ce qui limite leur utilité d'agent thérapeutique, vaccinant ou de diagnostic.

Pour beaucoup d'agents, la dégradation n'est pas un problème sérieux (par exemple, en suivant les indications du fabricant, on évite les problèmes associés éventuellement avec l'utilisation d'un vaccin périmé). Néanmoins, même dans le meilleur des cas, l'augmentation de la durée de vie de l'ordre de 50% à 100% (à

la température de 20 °C) d'un produit thérapeutique, sera la bienvenue (par exemple: le vaccin contre la poliomyélite).

Pour d'autres agents, le stockage sous forme de poudre lyophilisée est tout à fait satisfaisant, la dégradation commençant simplement au moment de l'incorporation dans un milieu aqueux.

Pour plusieurs autres agents, les problèmes de stockage sous forme sèche ne peuvent pas être résolus. Pour certains, stables sous forme sèche, la dégradation en milieu aqueux est tellement rapide que la stabilité présente un problème, même dans la courte période entre l'incorporation en milieu aqueux et l'utilisation.

Il y a plusieurs facteurs causant la dégradation : les procédés de fabrication, les enzymes de dégradation (les enzymes protéolytiques, les nucléases, les lipases, les enzymes glycolytiques), les agents d'oxydation ou de réduction (comme l'oxygène, ou les produits chimiques organiques ou inorganiques), la contamination microbienne.

Les liaisons chimiques faibles sont importantes pour les macromolécules biologiques.

La dénaturation thermique ne peut pas être évitée, en raison des nombreuses liaisons chimiques faibles qui caractérisent les macromolécules biologiques. Néanmoins, cela peut-être limité, par exemple, en gardant les températures relativement basses (réfrigération ou congélation). Parfois, de faibles augmentations de température peuvent produire des changements spectaculaires dans l'activité des agents biologiques. De tels changements impliquent la rupture d'une organisation moléculaire qui dépendent des effets coopératifs non-associés avec la dénaturation spécifique d'une protéine ou d'un acide nucléique spécifique.

Afin de remédier au phénomène de déstabilisation, on peut utiliser des adjuvants tel que $MgCl_2$, (pour le vaccin contre la poliomyélite) le polyéthylène glycol, etc; cependant ceux-ci peuvent présenter l'inconvénient de ne pas toujours (en fonction des concentrations) être physiologiquement appropriés.

Pour chaque température ambiante, il y a un spectre d'énergie disponible pour les changements de structure dans une macromolécule ou dans un complexe macromoléculaire (REF: Watson, James et al. pages 126 à 162, Molecular Biology of the Gene, 4th Edition (1987) Publishers Benjamin Cummings, ISBN 0-8053-9612-8). Dans le pire des cas, ces changements peuvent être associés à la rupture ou à la création de liaisons chimiques covalentes. Les énergies moins importantes seront peut-être suffisantes pour la création ou la rupture des liaisons chimiques secondaires (les liaisons

hydrogène, les interactions hydrophobes, les interactions de Van-der-Waals) qui jouent un rôle important dans les processus biologiques et les activités des macromolécules biologiques. L'importance des liaisons discutées ci-dessous, est la plus prononcée entre les températures de 0°C et 45°C, correspondant à la gamme des températures associées aux processus vivants dans les organismes supérieurs.

Ces interactions faibles sont toutes favorisées par une complémentarité de structure physique. Par exemple, une hormone et son site d'attachement sont liés par plusieurs liaisons faibles. La complémentarité de structure augmente le nombre des interactions du type Van-der-Waals, hydrophobes ou hydrogène, et ainsi évite l'effet disruptif de l'énergie ambiante.

L'eau elle-même joue un rôle important dans la stabilisation des macromolécules en milieu aqueux.

Les liaisons hydrogène entre les molécules d'eau ordonnent la structure. La structure peut-être mise en évidence avec les techniques de diffraction des rayons-X ou des neutrons.

A la périphérie des macromolécules, des molécules d'eau forment une sorte de couche, d'une profondeur de plusieurs molécules d'eau. Comme une cage, cette couche, renforcée par les liaisons hydrogène - entre des molécules d'eau et entre des molécules d'eau et les macromolécules - a pour effet de préserver l'intégrité du contenu.

La structure électronique de l'eau permet le libre échange des protons (noyaux des atomes d'hydrogène) entre les éléments du treillis d'eau et avec les sites favorables sur les macromolécules en milieu aqueux.

Dans les macromolécules, les molécules d'eau servent souvent de rôle de composant structurel, créant des ponts rigides entre les résidus protéiques, des bases nucléiques, des glucides ou des composants polaires des lipides. Les études cristallographiques montrent clairement l'inclusion des molécules d'eau dans plusieurs cristaux macromoléculaires. L'effet cumulatif coopératif de ces ponts moléculaires dans les structures comme les virus picorna est très sensible aux augmentations de température.

L'eau lourde (ou l'oxyde de deutérium, D₂O ou ²H₂O) a été découverte par Urey en 1932. Cette découverte a précipité un intérêt immédiat, surtout concernant les éventuelles répercussions sur la chimie de la vie. Pendant des années 1932-1939, plus de 200 publications ont montré les effets de l'eau lourde sur les organismes vivants et leurs physiologie et biochimie. Dans tous les cas, D₂O a été utilisée pour remplacer (entre 5% et 100%) H₂O dans les milieux

aqueux, mais les résultats obtenus n'ont pas permis de considérer l'eau lourde comme un agent stabilisateur.

Pendant les années 1970-80, l'eau lourde est devenu un outil important, dans le domaine des études biophysiques, tel que la RMN (résistance magnétique nucléaire) ou la diffusion des neutrons monochromatiques.

Pour la RMN, le noyau de deutérium possède l'atout de ne pas avoir de spin nucléaire. En milieu H_2O , dans un champs magnétique, les signaux de fréquence radio émis par les noyaux excités ne peuvent pas être détectés, parce que tous les hydrogènes de l'eau créent un bruit de fond énorme. Dans le milieu D_2O , l'eau ne contribue pas à un bruit de fond, et la technique de résonance magnétique des protons est devenue très puissante- surtout pour les molécules qui contiennent des protons (1H) et qui sont solubilisées par D_2O .

Les propriétés nucléaires des noyaux H et D sont bien différentes. Pour un faisceau de neutrons, le deutérium est relativement transparent, tandis que l'eau ordinaire est relativement opaque (Stuhrman H. (1974) J. Appl. Cryst. 7, 173-187). Les diverses techniques permettent la différenciation des informations structurales venant des différentes macromolécules. La cristallographie des neutrons est devenu un outil puissant.

Ceci étant, bien qu'il soit connu que l'eau lourde apporte une augmentation d'énergie des liaisons hydrogène par un facteur de 0,24 kilocalorie par mole, rien ne permettait de prévoir l'influence de l'eau lourde sur la stabilisation de molécules solubilisées par l'eau, car interviennent des phénomènes autres que la nature de la liaison entre le solvant et la molécule, ces phénomènes tels que l'effet cage, étant à ce jour mal connus. Les effets coopératifs eau/ADN/protéines à l'intérieur des virus restent également à ce jour mal connus. Les confirmations peuvent éventuellement être données par les études cristallographiques (neutrons et rayons X).

L'un des buts de l'invention est de proposer des compositions pharmaceutiques stabilisées, physiologiquement compatibles.

L'un des buts de l'invention est de fournir un ensemble de compositions pharmaceutiques stabilisées, dans lesquelles les doses d'agents pharmaceutiques peuvent être réduites par rapport aux mêmes compositions thérapeutiques non stabilisées.

L'un des autres aspects de l'invention est de proposer un procédé de préparation simple d'un ensemble de compositions pharmaceutiques, notamment thérapeutiques, vaccinales ou de diagnostic, stabilisées.

Ces différents aspects sont obtenus par les compositions de l'invention.

A cet égard, la composition pharmaceutique stabilisée de l'invention, comprenant une ou plusieurs macromolécule(s) choisie(s) parmi les acides nucléiques, les lipides ou les glucides et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), est caractérisée en ce qu'elle comporte un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), l'un au moins de ces véhicules contenant de l'eau lourde (D_2O).

On a trouvé que la substitution de la totalité ou d'une partie des noyaux d'hydrogène par des noyaux de deutérium, dans les molécules d'eau qui servent de solvant à une molécule ou à un complexe macromoléculaire qui constitue la substance active d'une composition pharmaceutique, permettait de stabiliser ladite composition pharmaceutique.

Dans la nature, l'hydrogène est composé de 0,0156% de deutérium. Celui-ci peut-être purifié par la distillation ou l'électrolyse de l'eau, pour obtenir de l'eau lourde pure, qui peut-être alors électrolysée pour obtenir du deutérium pur.

L'invention concerne l'utilisation de D_2O , ou des mélanges de D_2O et de H_2O , comme agents de stabilisation des macromolécules choisies parmi les acides nucléiques, les lipides ou des glucides ou des complexes macromoléculaires en phase aqueuse (solutions, suspensions ou émulsions).

Dans le contexte de cette invention, ce sont les propriétés de l'oxyde de deutérium, ou eau lourde, qui sont particulièrement intéressantes. Les noyaux H ou D qui s'échangent librement entre les molécules d'eau et entre les nombreux sites des macromolécules biologiques dissoutes, suspendues ou émulsifiées. D et H sont librement échangeables entre les sites d'hydrogène labiles, par exemple tous les hydrogènes dans la masse d'eau, ou beaucoup d'hydrogènes dans les macromolécules biologiques. D'autres hydrogènes, parfois cachés dans le milieu hydrophobe, sont moins accessibles, mais à l'issue d'une période variable, peuvent eux aussi être échangés.

Dans H_2O , D_2O ou des mélanges des deux, les propriétés physiques des solutions montrent une graduation linéaire des propriétés physiques (telles que la densité ou le point d'ébullition ou les valeurs molaires pour l'énergie des liaisons hydrogènes).

Les macromolécules et complexes macromoléculaires visés dans l'invention sont tels qu'ils ont un poids moléculaire d'au moins 1500 Da, et avantageusement supérieur à 5000 Da.

Pour fixer les idées, la stabilisation des macromolécules est telle que pour une température donnée, par exemple aux environs de 40°C, on peut observer une augmentation de stabilité des macromolécules ou complexes

macromoléculaires, conservés dans une solution contenant D₂O, par rapport à ces mêmes macromolécules ou complexes macromoléculaires conservés dans une solution contenant H₂O.

Par exemple, pour les virus de la poliomyélite (voir résultats), cette stabilisation se traduit par une augmentation du nombre de particules virales actives d'un facteur d'environ 10³ à environ 10⁴.

Comme indiqué ci-dessus, les macromolécules visées dans l'invention sont des acides nucléiques, des glucides ou des lipides.

Quant aux complexes macromoléculaires, ils sont avantageusement choisis parmi les complexes protéines-glucides, protéines-lipides, acides nucléiques-glucides, acides nucléiques-lipides, acides nucléiques-protéines, éventuellement complexés avec des glucides et/ou des lipides, et parmi les virus.

A titre d'exemples de macromolécules biologiques et de complexes macromoléculaires, susceptibles d'entrer dans les compositions de l'invention figurent:

1) les acides nucléiques:

l'ADN, pour les applications *in vivo* (par exemple: thérapie génique) et *in vitro* (par exemple: applications diagnostiques);

l'ARN, des ribozymes pour les applications *in vivo* (modifications des acides nucléiques ou des complexes acides nucléiques/protéines);

l'ADN et l'ARN, font partie des génomes des virus utilisés comme vecteurs dans la thérapie ou la vaccinologie;

des complexes d'ADN/ARN naturels ou artificiels;

les acides nucléiques utilisés peuvent être ceux existant sous des formes naturelles ou artificielles (créées par le génie génétique);

2) les glucides:

ces macromolécules n'ont pas encore trouvé d'applications comme thérapeutiques indépendantes, mais dans leurs complexes avec les protéines, elles sont reconnues comme facteur majeur dans la modification des activités de ces protéines; les différentes formes glucidiques peuvent invoquer des activités physiologiques significatives (comme c'est le cas pour la tPA, où les différentes "glycoformes" ont des activités bien différentes);

3) les lipides:

les macromolécules lipidiques jouent des rôles importants dans les membranes cellulaires, mais hormis les molécules relativement petites comme les prostaglandines et les vitamines de groupe A, ces agents n'ont pas trouvé beaucoup d'applications thérapeutiques; leur intérêt se trouve dans leurs complexes macromoléculaires et en particulier dans leurs utilisations dans les

liposomes utilisés comme systèmes de livraisons pour d'autres agents thérapeutiques;

4) les complexes macromoléculaires:

les plus typiques sont les complexes des acides nucléiques et les protéines, ou les protéines et les glucides;

un virus est un complexe macromoléculaire composé éventuellement d'acides nucléiques, de protéines, de glucides et de lipides (par exemple, le virus de la grippe ou le virus HIV);

on peut également citer les complexes artificiels, telle qu'une couche lipidique enrobant un agent thérapeutique, ciblé par des activités localisées dans la couche lipidique, ayant une spécificité de liaison avec des composants de la cible visée.

Les compositions pharmaceutiques impliquées dans la présente invention peuvent être définies par:

A - soit une ou plusieurs macromolécule(s) et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), maintenus dans un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s),

B - soit une ou plusieurs macromolécule(s), et un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), maintenus séparément par rapport à un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), la (les) macromolécule(s), le (les) complexe(s) macromoléculaire(s) et le (les) véhicules pharmaceutiquement acceptable(s) étant destinés à être rassemblés en vue de l'administration à un patient,

C - soit au moins deux éléments, maintenus séparément les uns par rapport aux autres, et comportant chacun une ou plusieurs macromolécule(s) et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), l'un au moins de ces éléments étant en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable contenant de l'eau lourde, ces différents éléments étant destinés à être rassemblés en vue de l'administration à un patient,

D - soit au moins deux des compositions pharmaceutiques selon l'une des variantes A, B, ou C, maintenues séparément l'une par rapport à l'autre et destinées à être rassemblées en vue de l'administration à un patient.

A titre d'exemple, une composition correspondant au rassemblement en vue de l'administration à un patient des variantes selon B et C comprend les caractéristiques suivantes:

- d'une part une ou plusieurs macromolécule(s) et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s) sont maintenus séparément par rapport à un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), et d'autre part au moins

deux éléments sont maintenus séparément les uns par rapport aux autres, et comportent chacun une ou plusieurs macromolécule(s) et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), l'un au moins de ces éléments étant en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable contenant de l'eau lourde, la (les) macromolécule(s), le (les) complexe(s) macromoléculaire(s), le (les) véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s) et les susdits éléments étant destinés à être rassemblés en vue de l'administration à un patient.

Les macromolécules et/ou les complexes macromoléculaires peuvent être conservés ou non avec le véhicule pharmaceutiquement acceptable contenant de l'eau lourde.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les compositions sont telles que les macromolécules ou les complexes macromoléculaires sont soit en suspension, soit en solution, soit en émulsion dans le véhicule pharmaceutique.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les compositions sont telles que la ou les macromolécule(s) et/ou le ou les complexe(s) macromoléculaire(s) et le véhicule pharmaceutiquement acceptable sont maintenus séparément et sont destinés à être rassemblés en vue de l'administration à un patient.

A titre d'exemple, les macromolécules et/ou les complexes macromoléculaires peuvent être lyophilisés et mélangés avec le véhicule pharmaceutiquement acceptable peu de temps avant l'administration à un patient, ou au moment de cette administration.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans les compositions de l'invention le volume du véhicule pharmaceutique varie d'environ 0,1 ml à environ 20 ml, notamment d'environ 0,1 ml à environ 5 ml, et la quantité de macromolécule ou de complexe macromoléculaire varie d'environ 1 μ g à environ 3g.

Selon un mode de réalisation avantageux pour une dose unitaire, la quantité de macromolécule ou de complexe macromoléculaire est d'environ 10 μ g pour un volume d'environ 1 ml de véhicule pharmaceutique.

Selon encore un autre mode de réalisation, dans les compositions de l'invention, le véhicule pharmaceutique est un mélange H₂O-D₂O et le rapport en poids entre D₂O et H₂O varie d'environ 10% à environ 100%, avantageusement d'environ 40% à environ 95%, et de préférence d'environ 80% à environ 95%.

En général, les mélanges D₂O/H₂O, contenant des concentrations élevées en D₂O (90-100%), donnent une stabilisation équivalente à une réduction de

température ambiante d'un facteur de 4-5°C (c'est à dire dans 95% de D₂O à 25°C - par exemple - une macromolécule subit un effet de dégradation qui équivaut à celui observé normalement dans H₂O à 20°C).

De plus, les concentrations élevées en D₂O offrent une protection importante contre les suites de la contamination microbienne. Peu de microbes tolèrent les concentrations de D₂O dépassant les 70%. Ainsi l'eau lourde est effectivement un milieu auto-stérilisant (à noter, que certains microbes, généralement non-pathogéniques, peuvent être adaptés à la vie en milieu D₂O).

Les compositions de l'invention sont non toxiques. En effet, il est connu que D₂O à une concentration inférieure à 10% de l'eau corporelle n'a pas d'effet toxique significatif. (Voir A. Barbour, H.G., (1937), Yale J. Biol. Med. 9, 551 - B: Barbour, H.G., (1938), Am. J. Cancer, 32, 440- C: Barbour, H.G. (1938), J. Pharm. Exp. Therap., 62, 158 - D: Barbour, H.G., (1936), J. Pharm. Exp. Rherap., 58, 460).

Les agents pharmaceutiques susceptibles de bénéficier de ces effets stabilisateurs sont souvent chers et contenus dans des petits volumes (vaccin oral, par exemple 0,15 ml); ainsi le prix relativement élevé de D₂O a moins d'importance.

Comme D₂O et H₂O sont entièrement miscibles, et comme les atomes d'hydrogène (¹H et ²H) labiles s'échangent rapidement, on peut constater qu'une dose de D₂O contenant un agent protecteur ou thérapeutique sera rapidement dispersée dans la masse d'eau corporelle. Avec une abondance naturelle de 0,0156% des atomes d'hydrogène, la masse de deutérium dans une personne de poids de 75kg sera d'environ 1g, équivalent à 10g d'eau lourde. L'administration des petits doses (par exemple: 0,1 à 5,0 ml) ne dépassera pas la quantité d'eau lourde déjà présente dans le corps d'un adulte. Même les doses très élevées (10 ml à 50 ml) ne contribuent pas à un niveau de deutérium (environ 0,1%) approchant les concentrations toxiques (soit 10% - 20%) ou mortelles (25% et plus).

L'eau lourde ne s'accumule pas dans l'organisme et elle est rejetée dans l'urine, la transpiration et la respiration, au même titre que l'eau.

En résumé, les expériences et les observations discutées démontrent qu'il y a un effet stabilisateur pour les macromolécules et leurs complexes, d'environ 5°C, associé à l'eau lourde. Malgré les changements de température relativement faibles et qui sont de l'ordre de 2°C à 5°C, les effets coopératifs mentionnés au-dessus peuvent contribuer à une augmentation importante de stabilité. Les macromolécules et même les organismes vivants (certains microbes, généralement non-pathogéniques, pouvant être adaptés à la vie en

milieu D₂O) ont montré une résistance aux températures normalement associées (en milieu H₂O) à la dénaturation thermique. Certains complexes ont montré une résistance réversible à la désagrégation induite par les solutions de faible force ionique (en H₂O, par exemple inférieure à KCl 1mM).

Dans les compositions de l'invention, le véhicule pharmaceutique peut contenir un adjuvant de stabilisation, avantageusement MgCl₂, de la carboxyméthyl cellulose, du polyéthylène glycol, des molécules glucidiques, tels que glycérol, glucose, sucrose, (et autres sucres C6), les sucres pentoses et leurs polymères (les amidons par exemple), ces molécules glucidiques pouvant être complexées avec le polyéthylène glycol, le polyéthylène glycol présentant avantageusement un poids moléculaire d'environ 500 à environ 5000 daltons, et notamment d'environ 1000 à environ 5000 daltons.

En application clinique, D₂O (et ses mélanges) peut également être utilisé avec les régulateurs de tonicité, de pH, de viscosité et d'autres agents stabilisateurs tels que ceux indiqués ci-dessus.

Dans les compositions de l'invention, le rapport en poids entre l'adjuvant de stabilisation et le véhicule pharmaceutique est tel que le véhicule pharmaceutique ne présente pas une viscosité supérieure à environ 0,2 Pascal-secondes (20 centipoises).

Dans les compositions de l'invention le rapport en poids entre l'adjuvant de stabilisation et le véhicule pharmaceutique est inférieur à environ 30%, et est avantageusement d'environ 1% à environ 30%, et de préférence encore d'environ 10% à environ 30%.

Dans les compositions de l'invention les complexes macromoléculaires et les macromolécules sont ceux utilisés:

- dans des compositions vaccinales, telles que celles contre la poliomyélite, contre la rougeole, contre l'hépatite, notamment l'hépatite B ou C, contre la grippe, contre le virus du syndrome immuno déficitaire acquis (virus du SIDA également désigné par HIV = human immunodeficiency virus), contre la diphtérie, contre le tétanos, contre la coqueluche ou contre une combinaison d'au moins deux des susdites pathologies, (par exemple le vaccin contre la diphtérie, le tétanos et la poliomyélite [DTP], ou le vaccin contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite et la coqueluche, commercialisé sous la marque TETRACOQ,
- en tant qu'agent de diagnostic, notamment pour le diagnostic de la rougeole, de la méningite ou de HIV ou,
- en tant qu'agent thérapeutique, tels que des acides nucléiques ou des ribozymes.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une composition pharmaceutique de l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- soit la dilution à l'aide de D₂O en quantité appropriée, de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solution aqueuse, préalablement concentrée, par exemple à raison de 20 mg/ml,
- et/ou la dialyse, contre D₂O en quantité appropriée, de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solution aqueuse,
- soit la resuspension de la susdite composition pharmaceutique, se présentant sous forme de solide, à l'aide de D₂O, en quantité suffisante pour obtenir la concentration appropriée de la composition pharmaceutique.

On utilise avantageusement la dialyse dans le cas où la composition pharmaceutique contient une substance active fragile, résistant mal aux autres traitements physiques.

L'invention concerne également un procédé de fabrication d'une préparation stabilisée d'origine virale, contenant des complexes macromoléculaires, caractérisé en ce que lesdits complexes macromoléculaires sont mis en solution, suspension ou émulsion dans un milieu contenant de l'eau lourde.

Par préparation d'origine virale, on entend notamment

- les virus complets, inactivés ou atténués,
- les protéines glycoprotéines virales, qu'elles soient de surface ou internes et qu'elles soient obtenues à partir de virus ou par recombinaison génétique connue, par exemple la protéine de surface du virus de l'hépatite B,
- les vecteurs viraux, tels que les adénovirus, les poxvirus comme le canary pox, ou le virus de la vaccine exprimant les protéines d'origine virale ou bactérienne (voir par exemple le brevet européen: EP 083 286),
- les acides nucléiques (ARN ou ADN) encapsulés ou non, connus par exemple sous le nom de "naked DNA" par la demande de brevet européen EP 465 529 (WO 90/11092), ou le brevet américain USP 4 394 448, qui décrit l'encapsulation de l'ADN ou de fragments d'ADN dans des vésicules lipidiques.

L'invention concerne également un procédé de stabilisation d'une préparation vaccinnante d'origine virale, notamment d'une suspension virale, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'incorporation d'eau lourde:

- soit au virus ou aux cellules à infecter, avant la mise en contact entre les cellules à infecter et le virus,
- soit dans le milieu de culture des cellules infectées par le virus,

- soit dans la préparation vaccinnante obtenue à l'issue de l'étape précédente.

L'eau lourde peut être ajoutée à n'importe quelle étape impliquée dans le procédé de préparation de la suspension virale, de préférence après la récupération des particules virales, à l'issue de l'étape de culture des cellules infectées par le virus.

Dans le cas d'un vaccin préparé sous forme lyophilisée, l'eau lourde peut être utilisée pour la préparation de la suspension virale, avant la lyophilisation et/ou pour la réhydratation du susdit vaccin lyophilisé. On utilise de préférence l'eau lourde au stade de la réhydratation.

Les vaccins auxquels s'appliquent avantageusement l'invention sont les suivants: grippe, varicelle, rougeole, oreillons, rubéole, dengue, HIV, herpès.

Les exemples cités ci-dessous ont purement une valeur illustratrice, et ne doivent pas être interprétés comme limitant la portée de cette invention.

Ils démontrent:

1:- la thermostabilisation d'un vaccin important;

2:- la stabilisation d'un complexe macromoléculaire modèle, illustrant la réversibilité des effets de thermostabilisation dus à D₂O et ses effets isotopes associés.

Ces exemples peuvent être appliqués aux cas suivants:

à un ribozyme,

au vaccin recombinant contre l'hépatite B et C,

au vaccin contre la grippe,

au vaccin contre la rougeole,

au vaccin DTP (diphtérie, tétanos, poliomyélite),

au vaccin contre le tétanos,

au kit pour le diagnostic d'HIV.

Il convient de noter que dans ce qui précède et ce qui suit, l'ensemble des documents de la littérature cités est incorporé par référence.

Descriptions des figures:

La figure 1 représente la thermostabilité, à 37°C, d'une composition pharmaceutique selon l'invention.

L'axe des abscisses correspond au temps (exprimé en jours) et l'axe des ordonnées correspond au logarithme de la concentration des particules virales (exprimé en unité DICC₅₀/ml, DICC₅₀ étant la dose infectieuse cytotoxique dans la cellule).

La courbe représentée par des losanges correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse; la courbe représentée par des carrés correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse, contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant; la courbe représentée par des triangles correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans de l'eau lourde à 95%; la courbe représentée par des croix correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans D_2O et contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant.

La figure 2 représente la thermostabilité à 42°C d'une composition pharmaceutique selon l'invention.

L'axe des abscisses correspond au temps (exprimé en jours) et l'axe des ordonnées correspond au logarithme de la concentration des particules virales (exprimé en unité $\text{DICC}_{50}/\text{ml}$).

La courbe représentée par des losanges correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse; la courbe représentée par des carrés correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse, contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant; la courbe représentée par des triangles correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans de l'eau lourde à 95%; la courbe représentée par des croix correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans D_2O et contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant.

La figure 3 représente la thermostabilité à 45°C d'une composition pharmaceutique selon l'invention.

L'axe des abscisses correspond au temps (exprimé en jours) et l'axe des ordonnées correspond au logarithme de la concentration des particules virales (exprimé en unité $\text{DICC}_{50}/\text{ml}$).

La courbe représentée par des losanges correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse; la courbe représentée par des carrés correspond à une composition pharmaceutique en solution aqueuse, contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant; la courbe représentée par des triangles correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans de l'eau lourde à 95%; la courbe représentée par des croix correspond à une composition pharmaceutique de l'invention, solubilisée dans D_2O et contenant MgCl_2 (à raison de 1M) comme adjuvant.

La figure 4 représente l'inactivation thermique du poliovirus Sabin de type 3. La concentration initiale du virus est fixée à 5×10^6 DICC₅₀/50 μ l. (DICC₅₀ = dose infectieuse cytotoxique dans la cellule).

Des suspensions du virus de Sabin de type 3 de titres égaux (5×10^6 DICC₅₀/50 μ l) sont préparés dans les milieux suivants:

a) Dulbecco-MEM dans l'eau normale (correspondant à l'abréviation "milieu H" sur la figure);

b) Dulbecco-MEM dans D₂O de concentration finale 87% (correspondant à l'abréviation "milieu D" sur la figure);

c) MgCl₂ 1M dans H₂O, Tris tamponné à pH 7.2 (correspondant à l'abréviation "milieu H-Mg" sur la figure); et

d) MgCl₂ 1M dans D₂O de concentration finale 87%, Tris tamponné à pH 7.2 (correspondant à l'abréviation "milieu D-Mg" sur la figure).

Après 3 jours d'incubation (partie A de la figure 4) et après 7 jours d'incubation (partie B de la figure 4) à 4°C, 37°C, 42°C et 45°C, le type du virus est déterminé. Les résultats sont exprimés comme différence de log de DICC₅₀/50 μ l entre le titre initial du virus maintenu à -30°C et le titre de chaque échantillon. La moyenne et l'erreur standard sont indiqués pour chaque résultat.

La figure 5 représente l'inactivation thermique du poliovirus Sabin de type 1 en présence de D₂O et/ou MgCl₂ (voir détails figure 4). La partie A de la figure 5 correspond à 3 jours d'incubation, et la partie B de la figure 5 correspond à 7 jours d'incubation.

La figure 6 représente l'inactivation thermique du poliovirus Sabin de type 2 en présence de D₂O et/ou MgCl₂ (voir détails Figure 4). La partie A de la figure 6 correspond à 3 jours d'incubation, et la partie B de la figure 6 correspond à 7 jours d'incubation.

La figure 7 représente la stabilisation du poliovirus Sabin de type 3, avec diverses concentrations d'eau lourde et de MgCl₂.

On réunit les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans la figure 4, sauf pour la concentration de D₂O (partie A de la figure 7) ou MgCl₂ (partie B de la figure 7).

Les résultats sont exprimés comme différence entre le titre initial de la suspension virale conservée à -30°C (log de DICC₅₀/50μl) et le titre de chacun des échantillons après 3 jours d'incubation à 45°C. Le titre initial du virus est de 5x10⁶ DICC₅₀/50μl.

La figure 8 représente la présence ou l'absence de sédimentation de PNN (noyau de nucléosome), selon la force ionique de l'eau, et selon la présence ou non d'eau lourde.

La sédimentation des PNN a été faite à pH 7,75 (en milieu de D₂O, pH 8,15 selon l'électrode de verre) 0,2mM EDTA, à une force ionique selon le Tableau 1 ci-après. Toutes les sédimentations sont faites dans le MSE CENTRISCAN, ultracentrifugeuse analytique, dans le rotor comportant 6 cellules de mesure à 50.000 t/mn. Les parties A à C correspondent à un intervalle de mesure de 6 minutes, les parties D à G correspondent à un intervalle de mesure de 8 minutes, longueur d'onde: 254nm; concentration des échantillons: 0,5 à 1,0 mg/ml.

L'axe des abscisses correspond au rayon de la mesure et l'axe des ordonnées à la concentration en ADN. Cette figure démontre que l'eau lourde consolide les particules de PNN autant que la force ionique.

EXEMPLE 1-

Thermostabilisation du poliovirus avec l'eau lourde

L'immunogénicité des virus atténués dans le vaccin de Sabin contre la polio, dépend de leur degré infectieux au moment de l'administration. Les niveaux de prises du vaccin oral contre la polio (OPV) sont liés à la dose de chacune des trois souches virales 1, 2 et 3, constituant le vaccin. Une explication pour les niveaux de prises assez bas dans certains pays du tiers monde, peut être les ruptures dans la chaîne du froid avant l'administration du vaccin. La souche 3 du vaccin de Sabin est très critique, à cause de son immunogénicité et de sa thermostabilité qui sont relativement médiocres.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) demande à ce jour que l'OPV soit stabilisé par l'addition de MgCl₂ (concentration 1 M) dans le vaccin. Loin d'être la solution idéale, (perte de moins de 0,5 log d'activité après sept jours à 45°C), cette méthode est actuellement le meilleur compromis.

Il est démontré ici que selon l'invention, l'eau lourde à 95 % offre, même sans aucun autre adjuvant, une stabilisation équivalente ou supérieure à celle offerte par MgCl_2 , en suivant les procédés entièrement standard (à part, bien sûr, le fait d'utiliser l'eau lourde).

Objectifs expérimentaux

Toutes les références à l'eau lourde (D_2O), dans les exemples ci-après, font référence à l'eau lourde à 95 %.

1 Détermination et quantification des effets de D_2O sur la stabilisation du vaccin de Sabin.

2 Comparaison des effets de thermostabilisation de: (a) D_2O et (b) D_2O additionné de MgCl_2 .

La souche type 3 est responsable de la plupart des problèmes associés au vaccin de Sabin. Pour cette raison, ce virus a été la cible des études préliminaires.

Contexte globale de l'étude sur le vaccin de polio.

Dans l'homme, l'immunogénicité de l'OPV est associée au caractère infectieux de la suspension virale. La possibilité que présente l'OPV de se dégrader dans les régions ayant des températures ambiantes élevées est un problème (voir ci-dessus). Pour l'OMS, le but d'éliminer la polio avant l'année 2000 dépend en partie de l'amélioration des procédés de stabilisation des vaccins actuels (surtout pour les pays en voie de développement).

Les résultats suivants montrent que la souche 3 du vaccin de Sabin, bénéficie d'une stabilisation très marquée dans l'eau lourde à 95 % (les autres conditions étant semblables à celles utilisées avec l'eau), sans autre agent de stabilisation. L'effet de D_2O est légèrement supérieure à la meilleure des solutions actuelles (MgCl_2 , 1M)

Méthodes expérimentales

La souche Sabin 3 est choisie comme modèle. La culture des virus est faite selon les procédés classiques.

L'addition d'eau lourde est effectuée en resuspendant le culot de virus (sédimenté dans une ultracentrifugeuse selon les conditions standard) dans D_2O (19 volumes) et un tampon PBS (tampon salin phosphaté) 20 fois concentré (1 volume). L'ultracentrifugation est sans gêne significative pour les virus. Les

études comparatives sont faites avec les milieux standard (H_2O , $H_2O/MgCl_2$ et $MgCl_2 + D_2O$).

La concentration du virus est ajustée à approximativement 10^{10} unités/ml dans D_2O à 95%.

Les virus sont soumis à différentes conditions thermiques selon les courbes montrées ci-après.

Virus - titration

Pour tous les échantillons, des dilutions en série sont effectuées (MEM Eagles avec sels d'Earle, 4%SVF, 3% bicarbonate de sodium, pénicilline, streptomycine). Une suspension de cellules Hep2C est ajoutée et l'ensemble est incubé à 35°C pendant 5 à 7 jours. Les plaques sont colorées avec du "noir de naphthalène" pour évaluer la viabilité des cellules. Les titres sont ensuite calculés. Chaque expérience comporte des contrôles.

Les résultats ci-après concernent la mesure de la stabilité des compositions de l'invention aux trois températures suivantes:

37°C,

42°C,

45°C.

RESULTATS, Jours à 37°C Log des unités virales, moyenne de trois échantillons

Jours	H_2O	$MgCl_2$	D_2O	$MgCl_2/D_2O$
0	10	10	10	10
2	8.6	9.5	9.6	9.6
5	7.8	8.1	8.1	8.2
7	6.8	7.5	7.7	7.8

RESULTATS, Jours à 42°C Log des unités virales, moyenne de trois échantillons

Jours	H_2O	$MgCl_2$	D_2O	$MgCl_2/D_2O$
0	10	10	10	10
2	5.4	8.8	9.4	9.3
5	3.4	5.4	6.0	6.2
7	2.8	5.2	5.5	5.4

RESULTATS, Jours à 45°C Log des unités virales, moyenne de trois échantillons

Jours	H ₂ O	MgCl ₂	D ₂ O	MgCl ₂ /D ₂ O
0	10	10	10	10
2	4.6	7.8	8.5	8.7
5	1.8	4.8	5.8	6.5
7	0.4	4.7	4.7	4.9

EXEMPLE 2

Stabilisation de l'architecture de la nucléosome par D₂O

Le noyau de la nucléosome (PNN) est composé de quatre paires de molécules protéiques, les histones H2a H2b, H3 et H4. Chaque octamère de protéine est entouré de 144 paires de base d'ADN, complétant 1,75 tours superhélicale (Noll M. (1974) Nature 251, 249-251; Kornberg R.D. (1974) Science 184, 868-871; Finch J. et al. (1977) Nature 269, 29-35). Gordon a étudié l'effet de la force ionique (en milieu H₂O) sur les propriétés de sédimentation de la PNN (Gordon V.C. et al. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci (USA). 75, 660-663). L'exemple ci-après illustre les différences importantes entre les propriétés de stabilisation de l'eau ordinaire et de l'eau lourde envers la PNN. La PNN peut être considérée comme une sorte de système modèle de la famille des complexes acide nucléique/protéine.

Méthodes expérimentales

La sédimentation des PNN préparées à partir d'érythrocytes de poulet (Suau P. et al (1977) Nuc. Acids. Res. 4, 3769-3786) est étudiée avec l'ultracentrifugeuse analytique (MSE CENTRISCAN) dans plusieurs conditions de force ionique et de concentrations en eau lourde. Plusieurs échantillons en H₂O sont après ré-équilibrés dans l'eau lourde en dialysant contre un volume important d'eau lourde, à diverses concentrations et compositions ioniques. Toutes les solutions sont tamponnées avec 0,2mM EDTA, pH 7,75 (en D₂O ajusté à pH 8,15 selon l'électrode de verre). La force ionique a été apportée par KCl.

Résultats

La sédimentation des PNN est dépendante de la composition ionique de l'eau. Très évidente est la désagrégation des PNN en milieu H₂O à faible

puissance ionique (Fig 4A). Dans l'eau lourde, cette dégradation des PNN ne se manifeste pas (Fig 4D). Même la dépendance ionique de la valeur de sédimentation (en unités Svedburg - s) devient très limitée (Voir Tableau 2 et Fig 4). La PNN désagrégée (4A), après dialyse contre l'eau lourde, redevient une particule discrète avec une sédimentation caractéristique pour une PNN.

Dans toutes les études, les PNN ont adopté - en milieu D₂O - la forme la plus compacte observée dans les milieux H₂O (après normalisation des valeurs de sédimentation pour corriger les différences de densité et de viscosité de l'eau lourde et de ses mélanges).

Dans les données complémentaires, non présentées ici, il est observé que la stabilisation à faible force ionique est manifeste à partir d'environ 40% de D₂O.

TABLEAU 1

Echantillon	[KCl] mM	Solvant	Valeur s	rayon de la première mesure (voir indice) mm
A	0	H ₂ O	-	63.15
B	5	"	10.2	63.15
C	25	"	11.2	65.43
D	0	D ₂ O	11.0*	63.29
E	25	"	11.2*	63.44
F- A redialysé	0	"	11.0*	63.00
G- C redialysé	0	"	11.1*	63.22

* valeurs corrigées selon viscosité et densité de D₂O.

Exemple 3: Stabilisation du vaccin poliovirus

Cette stabilisation est effectuée dans les conditions décrites dans les figures 4 à 7.

Les résultats représentés sur les figures 4 à 7 démontrent l'effet stabilisant de l'eau lourde. Quand les poliovirus (Sabin type 1, 2 et 3) sont préparés selon les procédures industrielles (dilution d'une suspension virale primaire: fluide surnageant clarifié de cultures de cellules infectées) en remplaçant les solutions

d'eau par des solutions contenant D₂O, dont la concentration finale est d'environ 90%, les résultats obtenus sont plus marquants que ceux obtenus avec les virus remis en suspension après la centrifugation (voir figs. 1-3).

Exemple 4: Stabilisation du vaccin poliovirus dans différentes solutions contenant de l'eau lourde.

L'addition de D₂O se fait au moment de la préparation du mélange de trois vaccins monovalents (Sabin de type 1, type 2, type 3) préparés en solution aqueuse. La concentration finale en D₂O est de 80%.

L'essai porte sur les formules suivantes:

1. Mélange albumine-MgCl₂ en solution aqueuse
2. Mélange albumine-MgCl₂ en solution contenant D₂O
3. Mélange acides aminés-MgCl₂ en solution contenant D₂O
4. Mélange acides aminés-saccharose en solution contenant D₂O

Titre global (DICC50/dose)							
Essais	70°C	7j à 37°C	perte (en log)	5j à 45°C	perte (en log)	7j à 45°C	perte (en log)
1 témoin alb.	6,63	5,48	1,15	3,47	3,16	3,20	3,43
2 alb. D ₂ O	6,57	5,90	0,67	4,67	1,90	4,13	2,44
3 A.A. DO	6,70	5,95	0,75	4,53	2,17	4,10	2,60
4 Sacch. D ₂ O	6,41	5,34	1,07	4,04	2,37	3,44	2,97

Exemple 5: Stabilisation du vaccin varicelle

Le virus Varicelle est un virus fragile.

La solution stabilisante habituelle du vaccin Varicelle a été préparée en solution aqueuse et en solution contenant de l'eau lourde (D₂O), à une concentration de 80%.

Une récolte de virus a été diluée dans les mêmes proportions avec chacun des stabilisants et lyophilisée. Les produits lyophilisés ont été réhydratés dans leur solvant respectif.

	Titres (PFU/dose) après réhydratation 2h à 37°C
H ₂ O	Perte = 0,69 log
D ₂ O	Perte = 0,37 log

PFU = unité conduisant à la formation de plaque.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique stabilisée comprenant une ou plusieurs macromolécule(s) choisie(s) parmi les acides nucléiques, les lipides ou les glucides, et/ou un ou plusieurs complexe(s) macromoléculaire(s), caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s), l'un au moins de ces véhicules contenant de l'eau lourde (D₂O).

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle les complexes macromoléculaires sont choisis parmi les complexes protéines-glucides, protéines-lipides, acides nucléiques-glucides, acides nucléiques-lipides, acides nucléiques-protéines, éventuellement complexés avec des glucides et/ou des lipides, et parmi les virus.

3. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les macromolécules ou les complexes macromoléculaires sont soit en suspension, soit en solution, soit en émulsion dans le véhicule pharmaceutiquement acceptable.

4. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la ou les macromolécule(s) et/ou le ou les complexe(s) macromoléculaire(s) et le véhicule pharmaceutiquement acceptable sont maintenus séparément et sont destinés à être rassemblés en vue de l'administration.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le volume du véhicule pharmaceutique varie d'environ 0,1 ml à environ 20 ml, notamment d'environ 0,1 ml à environ 5 ml, et la quantité de macromolécule ou de complexe macromoléculaire varie d'environ 1 µg à environ 3g.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le véhicule pharmaceutique est un mélange H₂O-D₂O et en ce que le rapport en poids entre D₂O et H₂O varie d'environ 10% à environ 100%, avantageusement d'environ 40% à environ 95%, et de préférence d'environ 80% à environ 95%.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le véhicule pharmaceutique contient un adjuvant de stabilisation, avantageusement $MgCl_2$, de la carboxyméthyl cellulose, du polyéthylène glycol, des molécules glucidiques, tels que glycérol, glucose, sucrose (et autres sucres en C6), pentoses et leurs polymères, ces molécules glucidiques pouvant être complexées avec le polyéthylène glycol, le polyéthylène glycol présentant avantageusement un poids moléculaire d'environ 500 à environ 5000 daltons, et notamment d'environ 1000 à environ 5000 daltons.

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que le rapport en poids entre l'adjuvant de stabilisation et le véhicule pharmaceutique est tel que le véhicule pharmaceutique ne présente pas une viscosité supérieure à environ 0,2 Pascal-secondes (20 centipoises).

9. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que le rapport en poids entre l'adjuvant de stabilisation et le véhicule pharmaceutique est inférieur à environ 30%, et est avantageusement d'environ 10% à environ 30%.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les complexes macromoléculaires et les macromolécules sont ceux utilisés :

- dans des compositions vaccinales, telles que celles contre la grippe, contre la poliomyélite, contre la rougeole, contre la varicelle, contre les oreillons, contre la rubéole, contre la dengue, contre l'hépatite, notamment l'hépatite B ou C, contre le virus du syndrome immuno déficitaire acquis (virus du SIDA), contre la diphtérie, contre le tétanos, contre la coqueluche ou contre une combinaison d'au moins deux des susdites pathologies, ou
- en tant qu'agent de diagnostic, tel que pour le diagnostic de la rougeole, de la méningite ou de HIV ou,
- en tant qu'agent thérapeutique, tels que des protéines, le facteur VIII, des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, des hormones, des acides nucléiques ou des ribozymes.

11. Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- soit la dilution à l'aide de D₂O de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solution aqueuse préalablement concentrée, par exemple à raison de 20 mg/ml,
- et/ou la dialyse contre D₂O de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solution aqueuse,
- soit la resuspension de la susdite composition pharmaceutique se présentant sous forme de solide, à l'aide de D₂O en quantité suffisante pour obtenir la concentration appropriée de la composition pharmaceutique.

12. Procédé de préparation d'une composition stabilisée contenant des complexes macromoléculaires d'origine virale, caractérisé en ce que lesdits complexes macromoléculaires sont mis en solution, suspension ou émulsion dans un milieu contenant de l'eau lourde.

13. Procédé de stabilisation d'une préparation d'origine virale, éventuellement vaccinante, notamment d'une suspension virale, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'incorporation d'eau lourde:

- soit au virus ou aux cellules à infecter avant la mise en contact entre les cellules à infecter et le virus,
- soit dans le milieu de culture des cellules infectées par le virus,
- soit dans la préparation vaccinante obtenue à l'issue de l'étape précédente.

1/8

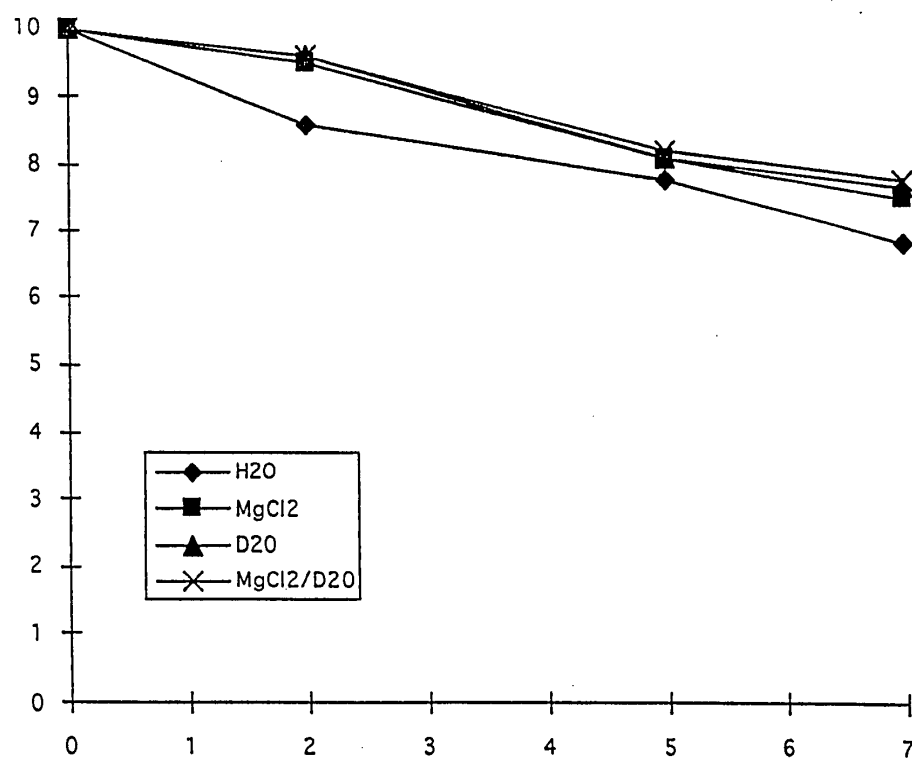


FIGURE 1

2/8

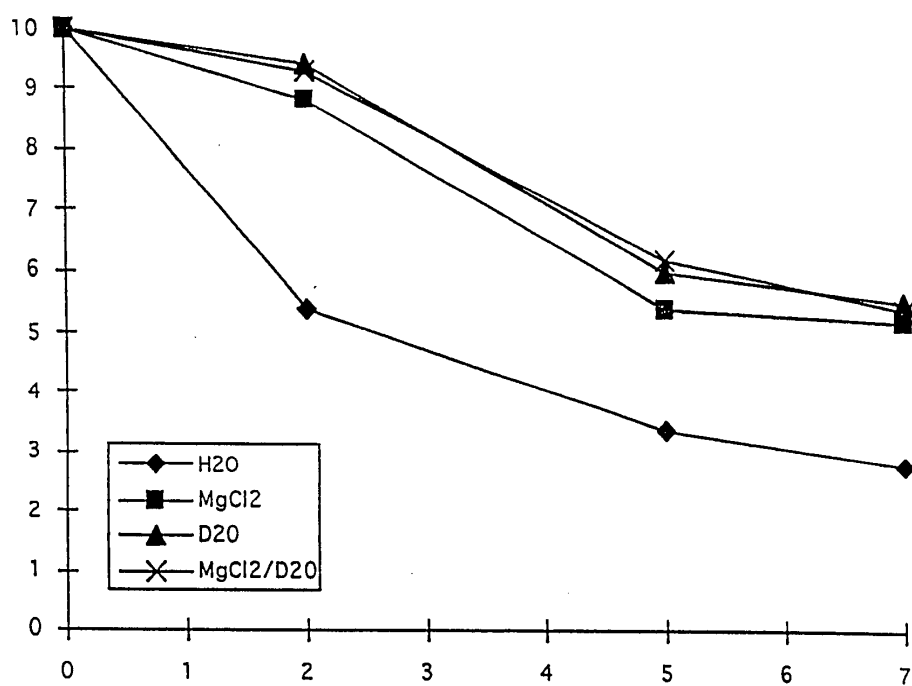


FIGURE 2

3/8

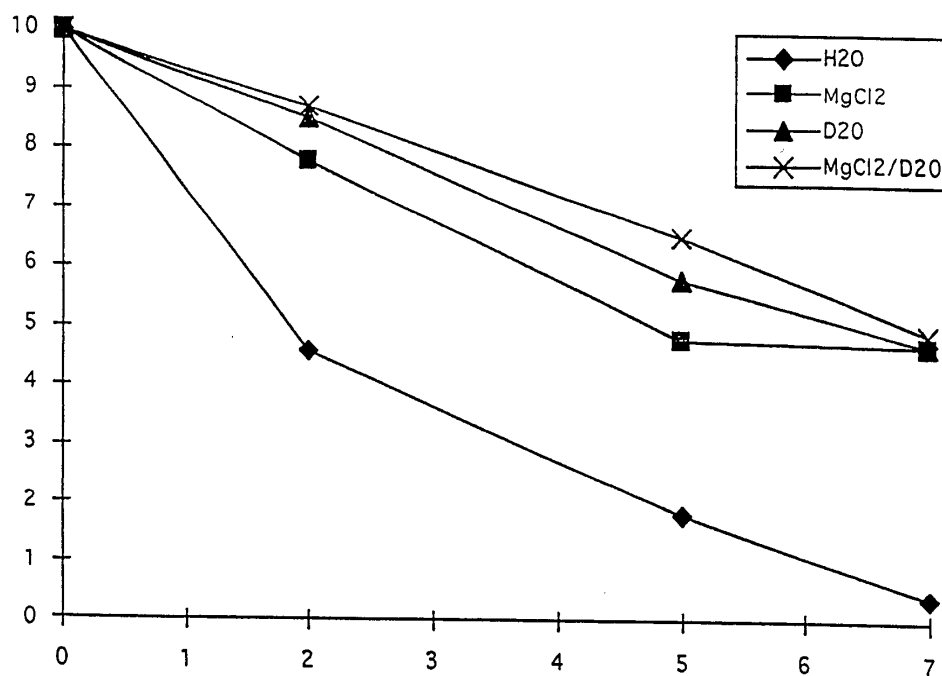
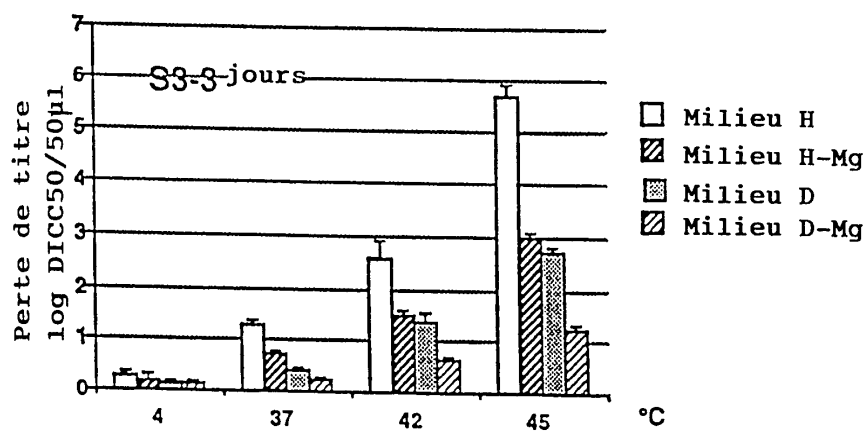


FIGURE 3

4/8

4A



4B

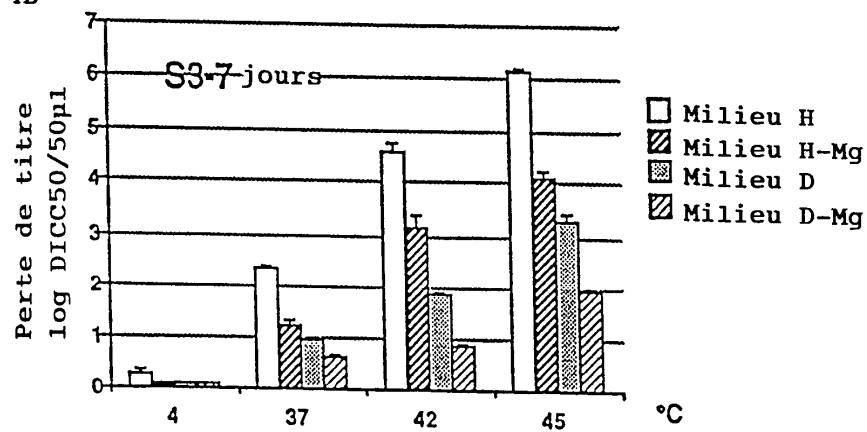
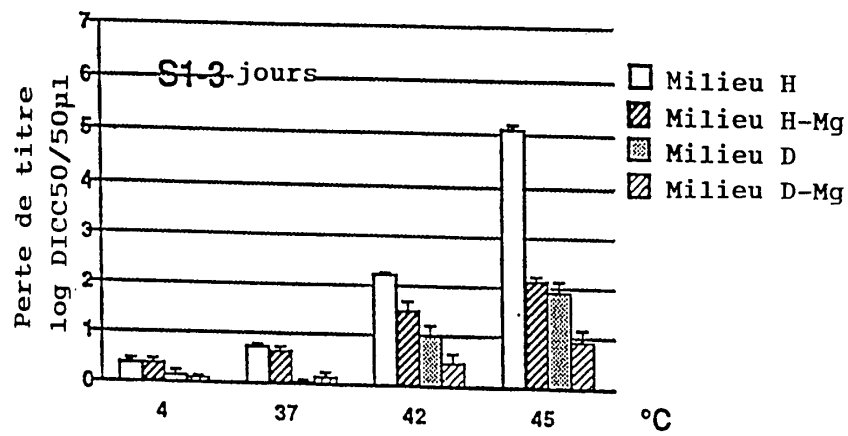


FIGURE 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

5/8

5A



5B

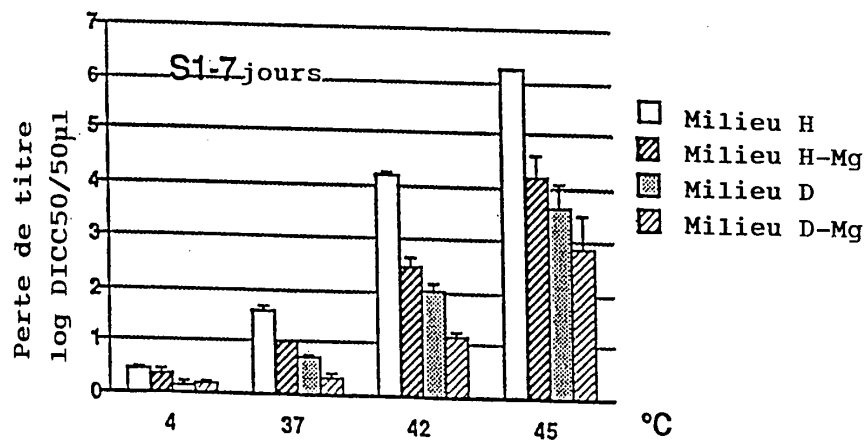
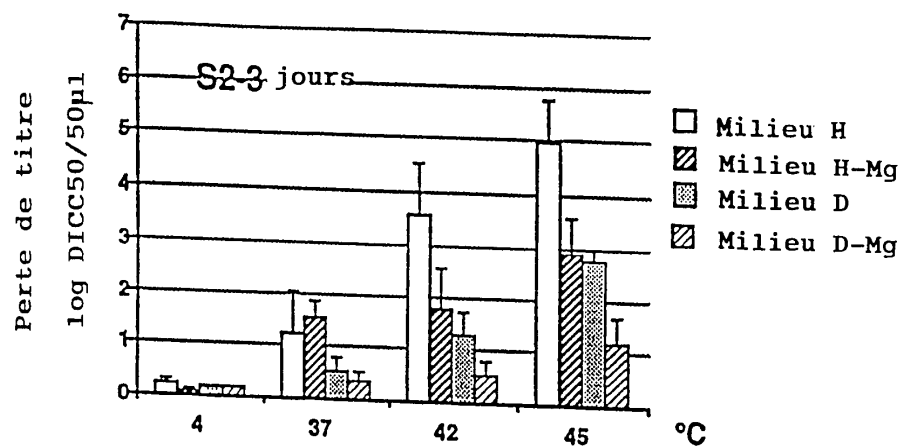


FIGURE 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

6/8

6A



6B

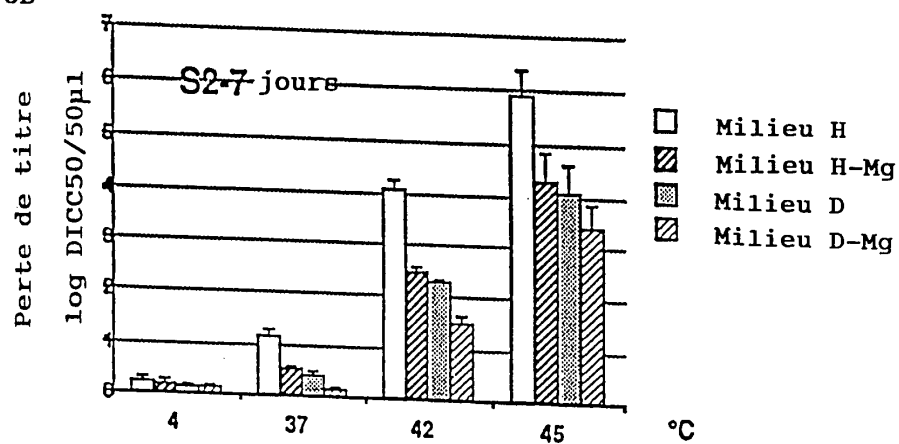


FIGURE 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

7/8

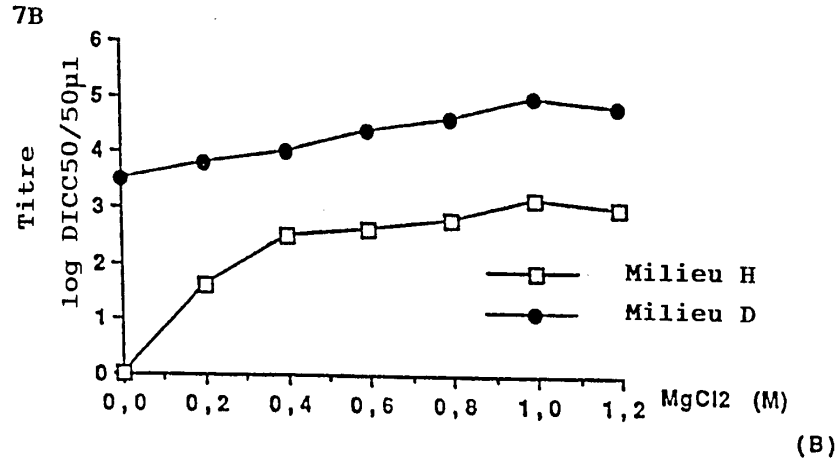
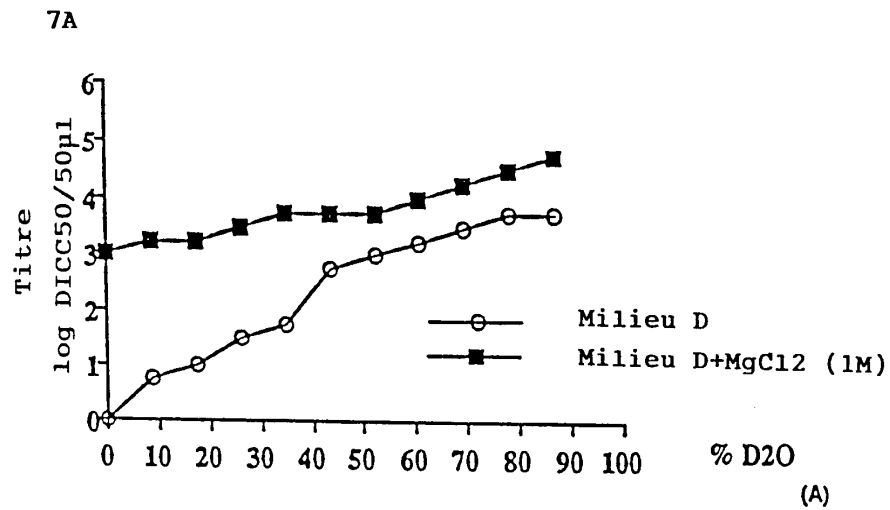


FIGURE 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

8/8

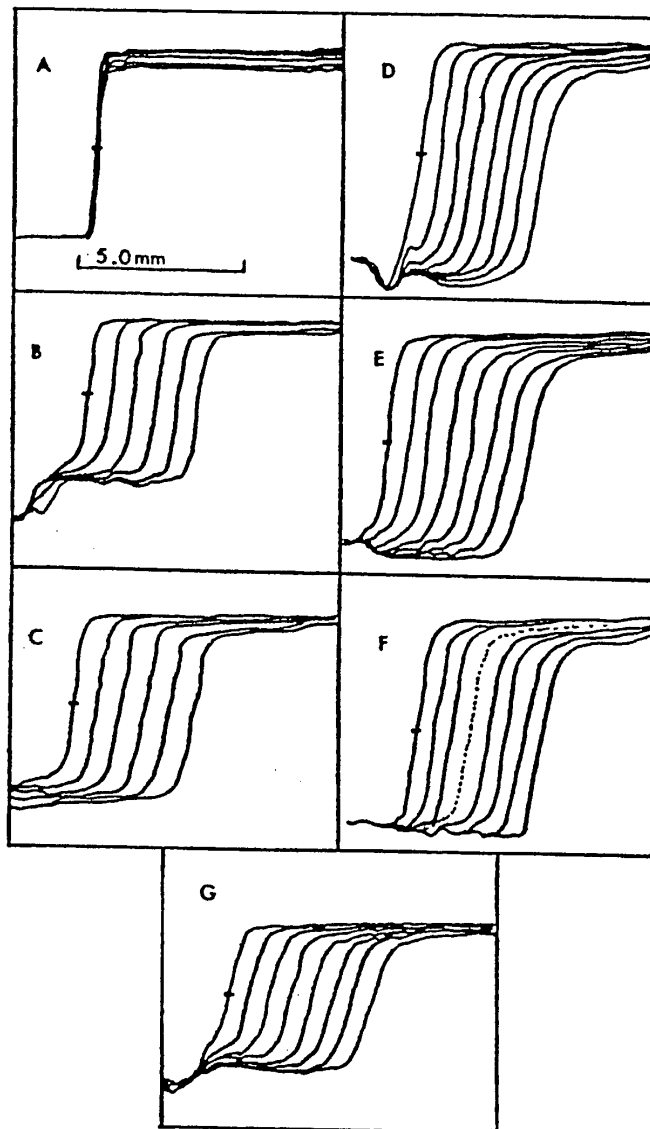


FIGURE 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/00296

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 A61K47/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 332 826 (TEVA) 20 September 1989 see the whole document ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 4, 27 January 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 28099b, see abstract & Z.NATURFORSCH. vol. 46, no. 9-10, 1991 pages 789 - 793 C.HEYDE ET AL. 'HEAVY WATER (D2O) PROTECTIVE EFFECT ON PROTEINS IN PHARMACEUTICALS.FOR EXAMPLE:HUMAN CHOLINESTERASE' --- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 May 1994		Date of mailing of the international search report 17.05.94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Scarponi, U

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/00296

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 17, 27 October 1986, Columbus, Ohio, US; abstract no. 148271w, see abstract & TSITOLOGIYA vol. 28, no. 8 , 1986 pages 790 - 795 V.YA.ALEKSANDROV 'STABILIZING EFFECT OF HEAVY WATER (D2O) ON THE CELL' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 19, 9 November 1981, Columbus, Ohio, US; abstract no. 164216n, see abstract & STUD.BIOPHYS. vol. 84, no. 1 , 1981 pages 69 - 70 U.LEMM ET AL. 'STABILIZATION OF BIOCHEMICALLY ACTIVE PROTEINS BY HEAVY WATER' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 5, 3 August 1981, Columbus, Ohio, US; abstract no. 37552u, see abstract & EUR.J.BIOCHEM. vol. 116, no. 3 , 1981 pages 441 - 445 U.LEMM ET AL. 'STABILIZATION OF ENZYMES AND ANTISERUMS BY HEAVY WATER' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 1, 7 July 1975, Columbus, Ohio, US; abstract no. 2787z, see abstract & DOKL.AKAD.NAUK.SSSR vol. 220, no. 6 , 1975 pages 1445 - 1448 V.YA.ALEKSANDROV ET AL. 'EFFECT OF HEAVY WATER (WATER-D2) ON THE RESISTANCE OF PROCOLLAGEN TO THERMAL DENATURATION AND TO THE ACTION OF COLLAGENASE' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 80, no. 23, 10 June 1974, Columbus, Ohio, US; abstract no. 130872y, see abstract & PROC.NAT.ACAD.SCI. USA vol. 71, no. 2 , 1974 C.S.PITTENDRIGH ET AL. 'VERY RAPID ENHANCEMENT BY DEUTERIUM OXIDE OF THE TEMPERATURE-TOLERANCE OF ADULT DROSOPHILA' ---	1-12

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No

PCT/FR 94/00296

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 23, 8 December 1969, Columbus, Ohio, US; abstract no. 110159g, see abstract & NUCL.SCI.ABSTR. vol. 23, no. 12 , 1969 page 22242 K.JUNG 'EFFECT OF HEAVY WATER ON THE THERMAL RESISTANCE OF MICROORGANISMS' ----	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 72, no. 15, 13 April 1970, Columbus, Ohio, US; abstract no. 76039b, see abstract & J. HYG. vol. 67, no. 4 , 1969 pages 679 - 690 P.R.M.STEELE ET AL. 'FACTORS AFFECTING THE VIABILITY OF FREEZE THAWED T4 BACTERIOPHAGE.II.INFLUENCE OF CERTAIN ELECTROLYTES ON THE DEGREE OF INACTIVATION.' ----	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 70, no. 21, 26 May 1969, Columbus, Ohio, US; abstract no. 94238d, see abstract & BIOFIZIKA vol. 14, no. 1 , 1969 pages 186 - 187 Y.B.POPOV ET AL. 'EFFECT OF DEUTERIUM OXIDE ON THE HEAT RESISTANCE OF STAPHYLOPHAGE.' -----	1-12

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

Information on patent family members

PCT/FR 94/00296

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. de Internationale No

PCT/FR 94/00296

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 5 A61K47/02		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 5 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 332 826 (TEVA) 20 Septembre 1989 voir le document en entier ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 4, 27 Janvier 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 28099b, voir abrégé & Z.NATURFORSCH. vol. 46, no. 9-10, 1991 pages 789 - 793 C.HEYDE ET AL. 'HEAVY WATER (D2O) PROTECTIVE EFFECT ON PROTEINS IN PHARMACEUTICALS.FOR EXAMPLE:HUMAN CHOLINESTERASE' --- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 30 Mai 1994		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 16 mai 94
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Scarponi, U

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

page 1 de 3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 94/00296

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 17, 27 Octobre 1986, Columbus, Ohio, US; abstract no. 148271w, voir abrégé & TSITOLOGIYA vol. 28, no. 8 , 1986 pages 790 - 795 V.YA.ALEKSANDROV 'STABILIZING EFFECT OF HEAVY WATER (D2O) ON THE CELL' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 19, 9 Novembre 1981, Columbus, Ohio, US; abstract no. 164216n, voir abrégé & STUD.BIOPHYS. vol. 84, no. 1 , 1981 pages 69 - 70 U.LEMM ET AL. 'STABILIZATION OF BIOCHEMICALLY ACTIVE PROTEINS BY HEAVY WATER' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 5, 3 Août 1981, Columbus, Ohio, US; abstract no. 37552u, voir abrégé & EUR.J.BIOCHEM. vol. 116, no. 3 , 1981 pages 441 - 445 U.LEMM ET AL. 'STABILIZATION OF ENZYMES AND ANTISERUMS BY HEAVY WATER' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 1, 7 Juillet 1975, Columbus, Ohio, US; abstract no. 2787z, voir abrégé & DOKL.AKAD.NAUK.SSSR vol. 220, no. 6 , 1975 pages 1445 - 1448 V.YA.ALEKSANDROV ET AL. 'EFFECT OF HEAVY WATER (WATER-D2) ON THE RESISTANCE OF PROCOLLAGEN TO THERMAL DENATURATION AND TO THE ACTION OF COLLAGENASE' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 80, no. 23, 10 Juin 1974, Columbus, Ohio, US; abstract no. 130872y, voir abrégé & PROC.NAT.ACAD.SCI. USA vol. 71, no. 2 , 1974 C.S.PITTENDRIGH ET AL. 'VERY RAPID ENHANCEMENT BY DEUTERIUM OXIDE OF THE TEMPERATURE-TOLERANCE OF ADULT DROSOPHILA' ---	1-12

-/--

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. de Internationale No

PCT/FR 94/00296

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 23, 8 Décembre 1969, Columbus, Ohio, US; abstract no. 110159g, voir abrégé & NUCL.SCI.ABSTR. vol. 23, no. 12 , 1969 page 22242 K.JUNG 'EFFECT OF HEAVY WATER ON THE THERMAL RESISTANCE OF MICROORGANISMS' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 72, no. 15, 13 Avril 1970, Columbus, Ohio, US; abstract no. 76039b, voir abrégé & J. HYG. vol. 67, no. 4 , 1969 pages 679 - 690 P.R.M.STEELE ET AL. 'FACTORS AFFECTING THE VIABILITY OF FREEZE THAWED T4 BACTERIOPHAGE.II.INFLUENCE OF CERTAIN ELECTROLYTES ON THE DEGREE OF INACTIVATION.' ---	1-12
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 70, no. 21, 26 Mai 1969, Columbus, Ohio, US; abstract no. 94238d, voir abrégé & BIOFIZIKA vol. 14, no. 1 , 1969 pages 186 - 187 Y.B.POPOV ET AL. 'EFFECT OF DEUTERIUM OXIDE ON THE HEAT RESISTANCE OF STAPHYLOPHAGE.' -----	1-12

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

page 3 de 3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De. .de Internationale No

PCT/FR 94/00296

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0332826	20-09-89	AU-A- 2951489 JP-A- 2022220	03-08-89 25-01-90

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)