

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/007956 A1

(43) Date de la publication internationale
17 janvier 2013 (17.01.2013)

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 39/39 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2012/051648

(22) Date de dépôt international :
12 juillet 2012 (12.07.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1156398 13 juillet 2011 (13.07.2011) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : SANO-
FI PASTEUR [FR/FR]; 2 Avenue Pont Pasteur, F-LYON
cedex 07 F-69367 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MATHIEU,
Yannick [FR/FR]; 14 rue Pierre Meister, F-68000 Colmar
(FR). LEBEAU, Bénédicte [FR/FR]; 12 rue d'Uffholtz, F-
68700 Wattwiller (FR). VALTCHEV, Valentin [FR/FR];
7 rue des Aubépines, F-14610 Basly (FR). PATARIN,
Joël [FR/FR]; 10 rue des Merles, F-68720 Flaxlanden
(FR). GARINOT, Marie [FR/FR]; 23 impasse de la
Ruche, F-69003 Lyon (FR). HAENSLER, Jean [FR/FR];
15 allée du Parc, F-69290 Grezieu La Varenne (FR). SAU-

ZEAT, Elisabeth [FR/FR]; 87 chemin des terres, F-69210
Lentilly (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : VACCINE COMPOSITION WITH ALUMINIUM HYDROXIDE NANOPARTICLES

(54) Titre : COMPOSITION VACCINALE AVEC DES NANOPARTICULES D'HYDROXYDE D'ALUMINIUM

(57) Abstract : A vaccine composition comprising at least one antigen and one adjuvant, characterized in that the adjuvant comprises sterile-filterable nanoparticles comprising pseudo-boehmite and polyacrylate.

(57) Abrégé : Composition vaccinale avec des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium Composition vaccinale comprenant au moins un antigène et un adjuvant, caractérisée en ce que l'adjuvant comprend des nanoparticules filtrables stérilement comprenant de la pseudo-boehmite et du polyacrylate.



WO 2013/007956 A1

Composition vaccinale avec des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium

La présente invention est relative au domaine des vaccins et plus particulièrement aux compositions vaccinales comprenant au moins un adjuvant. En particulier, l'invention

5 concerne une composition vaccinale comprenant des nanoparticules filtrables stérilement comprenant de la pseudo-boehmite et du polyacrylate (PAA).

Il est connu depuis très longtemps dans l'art antérieur que l'aluminium est intéressant pour adjuver les vaccins. De nombreux vaccins commercialisés en contiennent, soit sous forme d'hydroxyde, soit sous forme de phosphates ; ces dénominations ne reflétant

10 d'ailleurs pas exactement la composition chimique des produits correspondants : les hydroxydes d'aluminium sont plutôt des oxyhydroxydes, et les phosphates d'aluminium sont rarement des phosphates purs, mais contiennent très souvent d'autres ions,

notamment des sulfates, ainsi que des hydroxydes. Si ces adjuvants à base d'aluminium, encore appelés gels d'aluminium ont montré tout leur intérêt pour augmenter la réponse

15 immunitaire induite par un antigène, ils présentent cependant quelques inconvénients. D'un point de vue industriel, les suspensions traditionnelles d'hydroxyde ou de phosphate d'aluminium ne permettent pas, à cause de la taille trop grande des particules, de procéder en fin de production, à une stérilisation par filtration et imposent donc de recourir à un procédé de production se déroulant dans des conditions aseptiques. D'autre part, dans le

20 cas de certains modes d'administration, notamment la voie intradermique, il a été reproché à l'aluminium de conduire à un effet tatouage au site d'administration. Il est donc souhaitable de pouvoir disposer de compositions vaccinales comprenant de l'aluminium afin de bénéficier de ses pouvoirs adjuvant, tout en évitant ses inconvénients.

A cette fin, la présente invention propose une composition vaccinale comprenant au

25 moins un antigène et un adjuvant, caractérisée en ce que l'adjuvant comprend des nanoparticules filtrables stérilement comprenant de la pseudo-boehmite et du polyacrylate.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de nanoparticules filtrables stérilement comprenant de la pseudo-boehmite et du polyacrylate pour la préparation

30 d'une composition vaccinale comprenant au moins un antigène.

En particulier, l'invention a pour l'utilisation de telles nanoparticules qui permettent d'augmenter la réponse immunitaire induite lors de l'administration de ladite composition vaccinale.

La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation d'une composition

35 vaccinale comprenant au moins un antigène et un adjuvant, selon lequel :

- on prépare des nanoparticules filtrables stérilement comprenant de la pseudo-boehmite et du polyacrylate,
- on filtre lesdites nanoparticules au moyen d'un filtre stérilisant,
- on ajoute auxdites nanoparticules au moins un antigène vaccinal,
- 5 ○ et, de façon optionnelle, on procède si nécessaire à une filtration supplémentaire.

Grâce à l'objet de l'invention, il est possible d'avoir un adjuvant vaccinal induisant moins de réaction de réactogénicité que les suspensions d'aluminium utilisées classiquement,
10 notamment après administration par voie intradermique (ID) et permettant d'effectuer en fin de procédé de fabrication, une stérilisation par filtration.

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

Aux termes de la présente invention, les nanoparticules sont des particules dont la taille
15 permet leur passage à travers un filtre stérilisant, dont les pores ont un diamètre de 220 nm. Les particules ont donc une taille inférieure à 300 nm, car par déformation, de telles particules peuvent passer dans des pores de plus petite taille. Mais de façon préférée, les particules ont une taille inférieure à 220 nm, et même inférieure à 200 nm. De telles particules forment des suspensions colloïdales qui sont transparentes. Avantagusement,
20 on utilise des suspensions dont la majorité des particules ont entre 30 et 200 nm de diamètre, ce qui permet de les filtrer sans trop de perte de matière, avec un filtre stérilisant dont le seuil de coupure est 220 nm. Le diamètre des particules est un diamètre hydrodynamique qui peut être mesuré par différentes techniques ; par exemple on peut utiliser la diffusion quasi-élastique de la lumière. Cette technique permet de mesurer la
25 taille des particules dans une suspension colloïdale pour des rayons allant de 1 nanomètre à quelques micromètres. Les particules en suspension dans un liquide sont soumises au mouvement brownien (agitation thermique et chocs entre molécules du liquide et particules solides). Le principe d'une mesure en diffusion de la lumière consiste à bombarder les particules dans la suspension colloïdale par un rayonnement cohérent et
30 monochromatique type laser puis d'enregistrer les fluctuations de l'intensité lumineuse diffusée par ces particules à l'aide d'une photodiode à avalanche (dispositif permettant de compter le nombre de photons).

Ces expériences ont habituellement lieu dans des milieux très dilués transparents à l'oeil. Dans le cas de la présente invention, le diamètre des nanoparticules a été déterminé après

dilution (généralement 1/10) dans de l'eau déminéralisée. Le modèle de l'appareil utilisé était un Malvern ZetaSizer Nano ZS.

Selon l'invention, les nanoparticules sont des particules constituées essentiellement de pseudo-boehmite avec à leur surface du polyacrylate permettant d'éviter l'agrégation des nanoparticules après lavage des nanoparticules par dialyse. Selon un mode
5 particulier de l'invention, le polyacrylate est lié à la pseudo-boehmite par interactions de type électrostatique. Selon un mode de l'invention, la quantité de polyacrylate représente une masse inférieure à 10% de la masse des nanoparticules, plus particulièrement une masse inférieure à 9%, à 8%, à 7%, à 6%, à 5%, à 4%, à 3%, à
10 2%, à 1%. Selon un mode de l'invention, la quantité de polyacrylate représente une masse au moins égale à 1% de la masse des nanoparticules, plus particulièrement une masse supérieure à 2%, à 3%, à 4%, à 5%, à 6%, à 7%, à 8%, à 9%.

La qualification du constituant essentiel des nanoparticules de l'invention, en pseudo-boehmite peut être effectuée par analyse de diffraction aux rayons X, qui conduit à un
15 diffractogramme de rayons X caractéristique de pseudo-boehmite avec les principales raies (020), (021), (130), (150), (151), et (132) observées à 14, 28.1, 32.4, 49.3, 55.5 et 65° 2 θ ($\lambda=0.15406$ nm).

On utilise du polyacrylate car les polymères utilisés doivent être biocompatibles,
20 c'est-à-dire ne pas présenter de toxicité pour l'organisme auquel on les administre. En outre, le polymère utilisé doit être stable aux températures mises en œuvre lors de la synthèse des nanoparticules. Le polyacrylate utilisé peut être de différents poids moléculaire ; il peut notamment s'agir de polyacrylate de sodium ou de tout autre sel convenant pour un usage pharmaceutique. On a obtenu de bons résultats avec le
25 polyacrylate de sodium PAA 2100 fourni par la Société Fluka, ainsi qu'avec le PAA-60 000 de Polysciences.

Les particules sont préparées selon une méthode inspirée de la méthode décrite par S. Musić et coll. dans *Materials Chemistry and Physics*, 1999, 59, 12-19 ayant pour titre
30 « *Chemical and microstructural properties of Al-oxide phases obtained from AlCl₃ solutions in alkaline medium* ». Selon S. Musić et coll., on augmente le pH d'une solution aqueuse de sel d'aluminium par ajout d'une base (NaOH) jusqu'à une valeur légèrement supérieure à 11 en un laps de temps de 5 min (contrôle à l'aide d'un pH mètre). Après quoi, le mélange est agité vigoureusement pendant 10 min puis transféré

dans un autoclave et chauffé à 160°C pendant 24h. Le produit (solution blanchâtre et homogène) est récupéré par filtration sur Büchner, lavé puis séché une nuit dans une étuve à 65°C. Dans le cas de synthèses selon la présente invention, et ainsi que cela a été décrit par Y. Mathieu et coll. dans « *Control of the morphology and particle size of boehmite nanoparticles synthesized under hydrothermal conditions* » dans Langmuir 2007, 23, 9435-9442, la synthèse est effectuée en présence de polyacrylate de sodium que l'on ajoute au départ dans la solution aqueuse de sels d'aluminium. La présence de polymère va empêcher l'agglomération des particules formées. Les quantités relatives de polyacrylate et de sel d'aluminium sont sélectionnées afin de permettre de solubiliser le polyacrylate dans la solution de sel d'aluminium et d'obtenir des nanoparticules filtrables convenant comme adjuvant vaccinal. On a ainsi remarqué qu'avec le PAA 2100, il était avantageux de respecter un rapport molaire polyacrylate de sodium sur Aluminium compris entre 0,43 et 0,57.

Avant d'ajouter la base, le mélange polyacrylate de sodium et sel d'aluminium est soumis à une phase de murissement durant laquelle il est agité. Cette phase de murissement est avantageusement effectuée à température ambiante pendant environ 24 heures. D'un point de vue industriel, il est très intéressant de pouvoir travailler à température ambiante, sur une durée courte qui peut être prolongée si nécessaire pendant les week-ends par exemple.

Les sels d'aluminium permettant de produire des nanoparticules peuvent être de nature diverse ; il peut notamment s'agir de chlorure d'aluminium AlCl_3 , de nitrate d'aluminium $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ou encore de sulfate d'aluminium $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$; de préférence, on choisit le chlorure d'aluminium AlCl_3 .

Les bases que l'on peut utiliser pour augmenter le pH du mélange sont diverses et peuvent notamment être choisies parmi NaOH, KOH, ou NH_4OH . De façon avantageuse, on effectue la synthèse des nanoparticules en utilisant de la soude NaOH.

Selon l'invention, la soude est utilisée pour augmenter le pH jusqu'à une valeur d'environ 10-11 lors d'une opération durant entre 5 et 10 minutes. Durant cette phase d'augmentation de pH, les différentes espèces aluminiques en présence connaissent des modifications, telles que des dissociations et des réarrangements afin d'arriver à la formation d'une phase plus ou moins cristalline.

Selon l'invention, le mélange est ensuite soumis à un traitement hydrothermal pendant une durée pouvant aller de 1 à 17 heures ; de façon avantageuse au regard de la taille des particules obtenues et de leur filtrabilité, on choisit une durée de 3 heures. Ce traitement

est effectué soit en mode statique, soit sous agitation à une température comprise entre 90°C et 200°C, plus particulièrement à 160°C.

Selon l'invention, les nanoparticules obtenues sont filtrables stérilement ce qui signifie qu'elles ont une taille leur permettant de traverser un filtre stérilisant dont la taille des pores est de 220 nm ; les pertes observées lors d'une telle filtration sont compatibles avec des contraintes industrielles. En effet, des essais effectués sur des filtres PTFE (Polytetrafluoroéthylène) 0.22µm ont montré que l'on avait moins de 5% de perte en polymère et en aluminium, cette valeur de 5% pouvant correspondre à la marge d'erreur de la technique de dosage.

- 10 Selon l'invention, les nanoparticules peuvent être en suspension dans une solution saline ou un tampon biologique. Des essais ont notamment été réalisés en tampon PBS (Phosphate Buffered Saline), en tampon TRIS (trishydroxyméthylaminomethane), ou dans une solution saline comprenant 90g/l de NaCl, 0.12g/l de Na₂HPO₄, et 0.6g/l de KH₂PO₄.
- 15 Selon une caractéristique particulière de l'invention, la suspension comprenant les nanoparticules de pseudo-boehmite et de polyacrylate comprend également un tensioactif, notamment un tensioactif neutre tel que le BrijTM 58, le PluronicTM123 ou le TweenTM60, ou un tensioactif anionique tel que le SDS (dodecyl sulfate de sodium), ou encore un polymère tel que le PEG (polyéthylène glycol). Ainsi, on peut augmenter la stabilisation des nanoparticules formées par effet stérique ou par répulsion électrostatique.
- 20 Selon l'invention, la composition vaccinale comprend au moins un antigène. Aux fins de mise au point de la présente invention, on a utilisé la protéine tétanique purifiée comme antigène-modèle. Des essais ont ensuite été faits avec d'autres antigènes, notamment des antigènes de la grippe, l'antigène LSA3 de malaria, ou encore des antigènes recombinants de ETEC (*Enterotoxigenic Escherichia coli*). Cependant la composition vaccinale selon l'invention peut comprendre n'importe quel antigène pouvant être utilisé dans un vaccin, qu'il s'agisse d'un germe entier, d'un antigène sous-unitaire, naturel, recombinant, hybride,... peu important sa nature ; l'antigène peut en effet être un peptide, une protéine, une glycoprotéine, un polysaccharide, un glycolipide, un lipopeptide, une VLP (virus-like particle)...etc.
- 30

Ces antigènes sont des antigènes utilisés ou susceptibles d'être utilisés pour le traitement ou la prévention de diverses maladies susceptibles d'atteindre le monde animal et en particulier les être humains, notamment : diphtérie, tétanos, polio, rage, coqueluche, hépatites A, B, C, fièvre jaune, fièvre typhoïde, varicelle, rougeole, oreillons, rubéole,

encéphalite japonaise, grippe, méningites, choléra, infections à : Rotavirus, Norovirus, Rhinovirus, Respiratory Syncytial Virus, Herpes Simplex Virus, Papilloma Virus, Cytomegalovirus, West Nile Virus, Dengue Virus, Chykungunya Virus, HIV (SIDA), les affections bactériennes provoquées par : des streptocoques, Chlamydia trachomatis et
5 pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae et meningitidis, Moraxella catarrhalis, Staphylococcus aureus ou Haemophilus influenza type B, les listerioses, les shigelloses, les salmonelloses, la tuberculose, la maladie de Lyme, le cancer, les affections parasitaires telles que la malaria, les leishmanioses ...etc.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut être une composition destinée à
10 l'immunisation contre un seul pathogène ou cancer, c'est-à-dire qu'elle comprend un ou plusieurs antigènes d'un seul pathogène ou cancer, ou bien être une composition destinée à l'immunisation contre plusieurs pathogènes ou cancers (on parle alors de combinaison vaccinale). La composition selon l'invention peut également comprendre plusieurs antigènes spécifiques d'une seule maladie, mais appartenant à différentes catégories de
15 l'agent de cette maladie (plusieurs souches ou sérotypes, ou clades, suivant la nature de l'agent). Il peut également s'agir d'une composition vaccinale comprenant des allergènes, destinée notamment à une désensibilisation dans le cadre du traitement des allergies.

La composition vaccinale selon l'invention peut être administrée par toutes les voies habituellement utilisées pour l'administration des vaccins ; cependant, elle est d'un intérêt
20 particulier pour la voie intra-dermique. En effet, la voie intra-dermique, si elle semble très efficace pour induire de bonnes réactions immunitaires, a pour inconvénient de conduire parfois à des réactions de réactogénicité locale, qui peuvent freiner son utilisation. Grâce aux nanoparticules selon l'invention, il a été possible de réaliser des immunisations par voie intradermique en n'ayant que très peu ou pas du tout de réaction de réactogénicité, et
25 notamment pas d'effet tatouage ainsi que cela avait pu être le cas avec les suspensions d'aluminium de l'art antérieur.

Selon l'invention, on prépare la composition vaccinale par simple mélange d'une suspension comprenant les nanoparticules de pseudo-boehmite et de polyacrylate et une suspension d'antigènes. Cette opération peut se faire par ajout des antigènes dans une
30 suspension colloïdale comprenant les nanoparticules ou par ajout des nanoparticules dans une suspension comprenant déjà les antigènes. D'autre part, dans le cas où on souhaite disposer de compositions vaccinales comprenant plusieurs types d'antigènes, il peut être préféré d'effectuer en priorité l'adsorption de certains antigènes par rapport à d'autres. Notamment, dans le cas où la composition vaccinale comprend un mélange d'antigènes

dont certains, pour des raisons de stabilité ou d'immunogénicité, ne doivent pas être adsorbés, il peut être préférable de procéder de la manière suivante : on sature tout d'abord les particules à base d'aluminium avec les antigènes nécessitant une adsorption ou avec des ions ou excipients présents dans la substance tampon avant d'introduire les antigènes qui ne doivent pas être adsorbés.

Lors de la préparation des nanoparticules selon l'invention, il est possible qu'il y ait du polymère en excès. Pour éliminer cet éventuel excès de polymère, il est possible de procéder à une étape supplémentaire, soit directement après la phase de préparation des nanoparticules, soit après la phase de mélange avec l'antigène. Cette phase d'élimination peut être réalisée par dialyse ou diafiltration contre de l'eau déminéralisée (Milli Q, Millipore), une solution saline ou un tampon biologique, au travers d'une membrane de porosité adéquate (de 30 à 100 kDa suivant la taille des nanoparticules).

Les exemples qui suivent illustrent des modes de réalisation de l'invention.

Exemple 1 : Synthèse d'une suspension colloïdale de nanoparticules de pseudo-boehmite

On a utilisé du polyacrylate de sodium (NaPa) de masse moléculaire 2100 fourni par Fluka et du chlorure d'aluminium hexahydraté ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) fourni par Avocado.

On a dissous 9g de NaPa dans 75 ml d'une solution aqueuse de AlCl_3 0.1M. Le mélange résultant a été agité vigoureusement à température ambiante pendant 24h. Le pH du

mélange était alors compris entre 5.5 et 5.9. On a ensuite ajouté goutte à goutte de la soude NaOH 5M jusqu'à obtention d'un pH de 10.5 puis on a encore agité pendant 10 min. Lorsque l'augmentation de pH a atteint 9.0-9.5, la solution est devenue légèrement turbide, ce qui correspond à la précipitation des nanoparticules de pseudo-boehmite. Pour

obtenir les nanoparticules finales, la suspension obtenue à pH 10.5 a été transférée dans un autoclave et chauffée à 160°C sous faible agitation (15 trs/min) pendant 3 heures.

Ensuite, la suspension colloïdale a été lavée par dialyse contre 5l d'eau distillée grâce à un dispositif Sartorius Slice 200 Benchtop équipé d'une membrane en polyéther polysulfone de 30 kDa. La suspension colloïdale résultante a été stockée dans des flacons

en polypropylène. Les mesures de taille effectuées ont montré que l'on était en présence d'une population unique de nanoparticules dont la taille allait de 15 à 40 nm (distribution

en nombre), avec un index de polydispersité de 0.19 (analyse en intensité). Un échantillon de matériel solide a été obtenu par centrifugation à 25000 trs/min pendant 1 heure et séché à 80°C pendant toute une nuit, à des fins d'analyse physico-chimique.

L'échantillon a été analysé par diffraction de rayons X au moyen d'un diffractomètre STOE STADI-P utilisant la raie $K\alpha 1$ du cuivre ($\lambda=1.5406\text{\AA}$). Le rayonnement est parfaitement monochromatique grâce à la présence d'un monochromateur avant constitué d'un cristal de germanium. Pour cette analyse, les échantillons, préalablement broyés, sont placés dans des tubes de Lindemann (0.3mm de diamètre). Le tube capillaire, placé sur une tête goniométrique, est mis en rotation et le diffractogramme est enregistré en mode Debye-Scherrer à l'aide d'un détecteur linéaire court de type PSD (Position Sensitive Detector) pouvant couvrir une plage angulaire de 11° (2θ). L'analyse de diffraction aux rayons X de l'échantillon séché a donné un résultat caractéristique de pseudo-boehmite. Les nanoparticules obtenues ont pu être filtrées stérilement sur membrane $0.2\mu\text{m}$ en PVDF de Millipore, avec une perte minimale en matériel (3.1%) déterminée par absorption atomique.

Exemple 2 : Synthèse de nanoparticules de pseudo-boehmite et de polyacrylate à partir d'une solution de Polyacrylate de Sodium de masse molaire 60 000.

On a utilisé du polyacrylate de sodium (NaPa) de masse moléculaire 60000 fourni par Polysciences sous forme d'une solution aqueuse à 35% (w/w) et du chlorure d'aluminium hexahydraté ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) fourni par Fluka.

Afin d'obtenir 36g de polymère on a prélevé 102.86g de solution polymérique qui contenait 66.86g d'eau.

Dans un bécher, on a introduit 7.2429g d' AlCl_3 auxquels on a ajouté 225.89g d'eau. On a ajouté cette solution d'aluminium à la solution polymérique, afin d'obtenir 300 ml d'une solution 0.1M en AlCl_3 .

Le mélange obtenu était blanc.

On a agité ce mélange fortement pendant 24 heures.

Après 24 heures, le pH du mélange était de 6.1. On a ensuite ajouté goutte à goutte de la soude NaOH 5M jusqu'à un pH de 10.2.

Le mélange a été homogénéisé sous agitation pendant 1 heure, puis placé sous agitation (1400 tours/min) dans un autoclave et chauffé à 160°C pendant 3 heures.

La solution obtenue était légèrement opalescente, et a été analysée pour montrer qu'elle était constituée de nanoparticules présentant par diffraction de rayons X des pics caractéristiques de la pseudo-boehmite, et une taille moyenne autour de 100 nm, compatible avec une filtration stérilisante.

La solution a pu être conservée pendant plus d'1 an en maintenant l'intégrité des nanoparticules qui ne se sont pas réagréguées.

Exemple 3 : Préparation d'une composition vaccinale comprenant des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium et de la protéine tétanique purifiée, et test de filtration.

- 5 On a préparé une composition vaccinale en ajoutant 10 µl d'une préparation de protéines tétaniques purifiées dosée à une concentration de 1200 unités de floculation/ml de solution saline à 4.5 ml d'une suspension de nanoparticules de pseudo-boehmite préparée selon l'exemple 1.
- 10 Le mélange a été agité modérément puis passé au travers d'une membrane en PVDF (fournie par Millipore) montée sur une seringue plastique de 5ml.
- Une mesure de la taille des nanoparticules a été réalisée à la fois avant, et après l'addition de protéine tétanique sur les nanoparticules ; on a obtenu le même profil de taille, que ce soit en présence ou en absence de protéines, ce qui démontre que la protéine tétanique ne
- 15 conduit pas à l'agrégation des nanoparticules.
- De même, on a déterminé que la filtration conduisait à une perte en aluminium de 3%, ce qui est tout à fait acceptable d'un point de vue industriel.
- On peut donc en conclure que les compositions vaccinales selon l'invention peuvent être filtrées sans trop de perte de matière sur un filtre stérilisant de 0.22 µm.

20

Exemple 4 : Test de réactogénicité sur souris d'une composition selon l'invention comprenant des nanoparticules et des antigènes de la grippe, administrée par voie intradermique.

- 25 On a utilisé comme modèle-animal pour ce test, des souris BALB/c femelles afin d'évaluer la réactogénicité locale de compositions selon l'invention, comparativement aux suspensions d'aluminium classiques.
- Dans ce test, l'antigène est constitué par un vaccin grippe trivalent appelé Flu ID stock comprenant les souches fragmentées inactivées A/Solomon/3/2006 (H1N1),
- 30 A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), et B/Malaysia/2506/2004 à raison de 150 µg/ml de HA par souche.
- 4 groupes de 10 souris ont reçu à 3 semaines d'intervalle, par voie intradermique, dans la face interne de l'oreille, une dose de 30 µl sub-optimale (soit 0.3µg de HA/ souche) de vaccin en présence ou non d'un adjuvant.

Les compositions administrées ont été préparées de la manière suivante :

- 5
- Groupe A : Flu ID seul ; on a dilué 54 µl de Flu ID stock dans 756 µl de tampon PBS.
 - Groupe B : Flu ID + AlOOH ; on a ajouté successivement :
 - o 54 µl de Flu ID stock
 - o 604 µl de tampon PBS
 - o 152 µl d'une suspension commerciale d'AlOOH à 8.01mg/ml d'aluminium (Alhydrogel®)
- 10
- Le mélange a été agité modérément pendant 2 heures.
- Groupe C : Flu ID + AlPO₄ ; on a ajouté successivement :
 - o 54 µl de Flu ID stock
 - o 463 µl de tampon PBS
 - o 293 µl d'une suspension commerciale d'AlPO₄ à 4.15mg/ml d'aluminium (AdjuPhos®)
- 15
- Le mélange a été agité modérément pendant 2 heures.
- Groupe D : Flu ID + nanoAlOOH ; on a ajouté successivement :
 - o 54 µl de Flu ID stock
 - o 5 µl de H₂O
 - o 76 µl de tampon PBS concentré 10 fois
 - o 675 µl d'une suspension de nanoparticules de pseudo-boehmite, préparée de la manière décrite à l'exemple 1 et comprenant 1.8mg d'Al/ml
- 20
- 25
- Le mélange a été agité modérément pendant 2 heures à température ambiante.

30

Les souris ont été surveillées chaque jour, et on a noté sur une échelle non-officielle les œdèmes, les érythèmes et les lésions apparaissant à l'oreille, pendant 2 semaines après chaque injection.

Quelle que soit la formulation testée, aucun érythème significatif n'a été observé. De même, on n'a signalé aucun œdème.

Par contre, on a noté au point d'injection des nodules blancs/rougeâtres apparaissant chez les souris ayant reçu les compositions comprenant de l'aluminium classique, que

ce soit avec l'hydroxyde d'aluminium, ou avec le phosphate d'aluminium. Mais, de manière surprenante et très intéressante, aucun nodule n'est visible sur les souris ayant reçu une composition selon l'invention.

- 5 Les résultats relatifs aux nombres de souris présentant des nodules après administration des adjuvants comprenant l'aluminium de l'art antérieur, sont illustrés sur le tableau 1 dessous :

Tableau 1

Après la 1 ^{ère} injection (J0)											
Adjuvant	J1	J2	J3	J4	J7	J8	J9	J10	J11	J15	
AlOOH	0/10	0/10	0/10	0/10	6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	
AlPO ₄	0/10	1/10	2/10	3/10	6/10	9/10	9/10	9/10	10/10	9/10	
Après le rappel (D21)											
Adjuvant	J22	J23	J24	J25	J28	J29	J30	J31	J32	J35	J39
AlOOH	5/10	9/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	9/10
AlPO ₄	9/10	9/10	8/10	7/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

10

Il est particulièrement intéressant de constater que, malgré le fait que les quantités d'aluminium soit les mêmes (45µg) dans tous les groupes, le fait de le formuler en nanoparticules selon l'invention, rend cet aluminium bien mieux toléré.

- 15 Exemple 5 : Test d'immunogénicité sur souris d'une composition selon l'invention comprenant des nanoparticules et des antigènes de la grippe, administrée par voie intradermique.

- 20 Dans ce test, on a évalué l'immunogénicité des compositions selon l'invention, comparativement à des compositions comprenant de l'aluminium classique, que ce soit AlOOH ou AlPO₄, mais également vis-à-vis de composition ne comprenant pas d'aluminium mais uniquement du polymère.

- 25 Dans ce test, comme dans l'exemple précédent, l'antigène était constitué par un vaccin grippe trivalent appelé Flu ID stock comprenant les souches fragmentées inactivées A/Solomon/3/2006 (H1N1), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), et B/Malaysia/2506/2004 à raison de 150 µg/ml de HA par souche. Le lot de vaccin Flu ID stock utilisé pour ce test était le même que celui utilisé dans l'exemple précédent.

Le test a été réalisé sur des souris BALB/c femelles réparties en 5 groupes de 9.

Chaque souris a reçu, à 3 semaines d'intervalle, par voie intradermique, dans la face interne de l'oreille, une dose de 30 µl sub-optimale (soit 0.3µg de HA/ souche) d'une composition telle que décrite ci-après, en fonction de son groupe d'appartenance.

5

Les compositions administrées ont été préparées de la manière suivante :

10

- Groupe A : Flu ID seul ; on a dilué 54 µl de Flu ID stock dans 756 µl de tampon PBS.

15

- Groupe B : Flu ID + AlPO_4 ; on a ajouté successivement :
 - o 54 µl de Flu ID stock
 - o 463 µl de tampon PBS
 - o 293 µl d'une suspension commerciale d' AlPO_4 à 4.15mg/ml d'aluminium (AdjuPhos®)

Le mélange a été vortexé pendant 10 secondes.

20

- Groupe C : Flu ID + AlOOH ; on a ajouté successivement :
 - o 54 µl de Flu ID stock
 - o 595 µl de tampon PBS
 - o 161 µl d'une suspension commerciale d' AlOOH à 7.53mg/ml d'aluminium (Alhydrogel®)

Le mélange a été vortexé pendant 10 secondes.

25

- Groupe D : Flu ID + nanoparticules de pseudo-boehmite ; on a ajouté successivement :

30

- o 54µl de Flu ID stock,
 - o 5 µl de H_2O
 - o 76 µl de tampon PBS concentré 10 fois,
 - o 675 µl de suspension de nanoparticules de pseudo-boehmite, préparée de la manière décrite à l'exemple 1 et comprenant 1.8mg d'Al/ml.

Le mélange a été vortexé pendant 10 secondes.

- Groupe E : Flu ID + polymère ; on a ajouté successivement :
 - 54µl de Flu ID stock,
 - 5 µl de H₂O
 - 76 µl de tampon PBS concentré 10 fois,
 - 5 ○ 675 µl d'une solution à 17mg/ml de PaNa (polyacrylate de sodium) de
 masse molaire 2100 fourni par Fluka

Le mélange a été vortexé pendant 10 secondes.

On a surveillé les souris durant tout le test.

- 10 Des échantillons sanguins de chaque souris ont été prélevés à J42, soit 3 semaines après la 2^{de} injection, par section de la carotide. Les échantillons ont été traités afin d'isoler le sérum pour effectuer les tests de réponse humorale.

On a en outre prélevé les rates de 6 souris par groupe afin d'effectuer les tests de réponse cellulaire.

- 15 Les tests qui ont été réalisés sont des dosages ELISA, des tests d'inhibition de l'héماغglutination, ainsi que des ELISPOT.

Les dosages ELISA ont été réalisés de façon classique, afin de déterminer les quantités d'IgG1 et d' IgG2a sériques spécifiques de la souche A/H1N1. Le seuil de détection des anticorps est de 20 (1.3log10) unités ELISA. Tous les titres sont exprimés en log10

- 20 d'unités ELISA. Pour chaque groupe d'animaux, on a calculé la moyenne géométrique ainsi que l'intervalle de confiance 95% correspondant.

Le test d'inhibition de l'héماغglutination permet d'apprécier les anticorps fonctionnels présents dans le sérum des animaux immunisés. Il mesure la capacité des anticorps induits à inhiber l'héماغglutination de globules rouges de poulet par le virus grippal étudié. Le
25 titre d'inhibition de l'héماغglutination ou HI (Haemagglutination Inhibition) est l'inverse de la dernière dilution pour laquelle on n'observe pas d'héماغglutination. Pour chaque groupe d'animaux, on a calculé la moyenne géométrique ainsi que l'intervalle de confiance à 95% correspondant. Ceci vis-à-vis de chacune des 3 souches présentes dans la composition administrée.

30

Les dosages ELISPOT sont réalisés à partir des cellules spléniques fraîchement isolées, mises à incuber la nuit et restimulées avec un mélange des 3 souches de la composition vaccinale ou par un peptide 9-mer correspondant à un épitope de classe I (épitope CD8)

de la protéine NP. Les réponses cellulaires sont exprimées en nombres de cellules sécrétant de l'IL-5 ou de l'IFN- γ spécifiques de la grippe, pour 10^6 splénocytes.

Lors de la restimulation avec le peptide spécifique de la grippe, on n'a pas détecté, par ELISPOT de cellules T CD8+ sécrétant de l'IL-5 ou de l'IFN- γ ; ceci, quel que soit le

5

groupe de souris considéré.

En ce qui concerne la restimulation in-vitro par les antigènes de la grippe, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 2 ci-après, où les intervalles de confiance 95% sont indiqués entre crochets :

10

Tableau 2 :

Groupe considéré	Nbre de cellules sécrétrices d'IL-5 / 10^6 splénocytes	Nbre de cellules sécrétrices d'IFN- γ / 10^6 splénocytes
A : Flu ID seul	24 [12 – 48]	2 [0 – 17]
B : Flu ID + AlPO ₄	17 [6 – 45]	2 [0 – 32]
C : Flu ID + AlOOH	46 [19 – 115]	13 [5 – 38]
D : Flu ID + nanoparticules	197 [79-491]	79 [30-205]
E : Flu ID + polyacrylate	80 [42-151]	8 [1- 81]

Ces résultats montrent que, de façon surprenante, grâce aux nanoparticules selon l'invention, il est possible d'obtenir une réponse cellulaire, notamment une stimulation

15

des cellules sécrétrices d'IL-5 ainsi que des cellules sécrétrices d'IFN- γ .

D'un point de vue statistique, selon un modèle mixte avec ajustement de Dunnett, les nanoparticules sont considérées avoir augmenté significativement le nombre de cellules sécrétrices d'IL-5 et d'IFN- γ , de 8.2 fois ($p < 0.001$) et de 39.5 fois ($p = 0.002$), respectivement, ce qui n'est pas le cas des adjuvants à base d'aluminium de l'art

20

antérieur.

On remarque en outre que le polyacrylate seul n'a augmenté la sécrétion d'IL5 que de 3.3 fois ($p = 0.027$), à la limite de la significativité.

Les résultats relatifs aux tests de réponse humorale sont repris dans le tableau 3 ci-après où, à chaque fois, les intervalles de confiance 95% sont mis entre crochets.

Tableau 3 :

Groupe considéré	HI contre H1N1	HI contre H3N2	HI contre B	IgG1 contre H1N1 (log10)	IgG2a contre H1N1 (log10)
A : Flu ID seul	101 [52 – 194]	127 [66 – 244]	17 [6 – 46]	4.8 [4.4 – 5.2]	4.3 [3.9 – 4.6]
B : Flu ID + AlPO ₄	1881 [1096 – 3229]	1097 [654 – 1842]	593 [301 – 1165]	6.4 [6.2 – 6.7]	4.4 [3.9 – 4.9]
C : Flu ID + AlOOH	1185 [637 – 2207]	1185 [603 – 2331]	640 [353 – 1161]	6.4 [6.1 – 6.6]	4.1 [3.4 – 4.8]
D : Flu ID + nanoparticules	1185 [676 – 2078]	1613 [1017 – 2558]	508 [228 – 1130]	6.1 [5.9 – 6.4]	5.1 [4.7 – 5.4]
C : Flu ID + polyacrylate	93 [49 – 177]	148 [90 – 243]	13 [4 – 38]	5.0 [4.8 – 5.3]	4.1 [3.7 – 4.5]

- 5 D'un point de vue statistique, l'augmentation des titres HI et des titres en IgG1 obtenus avec les nanoparticules a été considérée significative vis-à-vis des titres obtenus avec le vaccin seul selon un modèle mixte avec ajustement de Dunnet (11.7 fois pour titre HI anti-H1N1 avec $p < 0.001$; 12.7 fois pour titre HI anti-H3N2 avec $p < 0.001$; 29.9 fois pour titre anti-B avec $p < 0.001$; 20.0 fois pour titre IgG1 anti-H1N1 avec $p < 0.001$ et 6.3
- 10 fois pour titre IgG2a anti-H1N1 avec $p = 0.008$).

Ces résultats montrent la capacité des nanoparticules selon l'invention à induire une réponse humorale après 2 immunisations par voie intradermique. On peut remarquer que le polymère seul n'a pas ce pouvoir adjuvant.

- D'autre part, seules les nanoparticules selon l'invention conduisent à une augmentation de
- 15 la réponse en IgG2a, qui signifie que le profil de la réponse immunitaire est plus orientée vers une réponse de type TH1 que les autres adjuvants à base d'aluminium.

REVENDICATIONS

1. Composition vaccinale comprenant au moins un antigène et un adjuvant, caractérisée en ce que l'adjuvant comprend des nanoparticules filtrables stérilement comprenant de la pseudo-boehmite et du polyacrylate.
5
2. Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que noyau de la nanoparticule est constitué essentiellement de pseudo-boehmite, et en ce que le polyacrylate est situé essentiellement en surface des nanoparticules.
10
3. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la pseudo-boehmite représente au moins 90% de la masse des nanoparticules.
- 15 4. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la taille des nanoparticules est inférieure à 300 nm, avantageusement inférieure à 220 nm.
- 20 5. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène de la grippe.
- 25 6. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une protéine tétanique.
7. Utilisation de nanoparticules filtrables stérilement comprenant de la pseudo-boehmite et du polyacrylate pour la préparation d'une composition vaccinale comprenant au moins un antigène.
8. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée en ce que la
30 composition vaccinale est destinée à être administrée par voie intradermique.
9. Utilisation selon une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que la composition vaccinale comprend au moins un antigène de la grippe.
- 35 10. Utilisation selon une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que lesdites nanoparticules permettent d'augmenter la réponse immunitaire induite lors de l'administration de ladite composition vaccinale.

11. Procédé de préparation d'une composition vaccinale selon une des revendications

1 à 6, selon lequel :

- on prépare des nanoparticules filtrables stérilement comprenant de la pseudo-boehmite et du polyacrylate,
- 5 ○ on filtre lesdites nanoparticules au moyen d'un filtre stérilisant,
- on ajoute auxdites nanoparticules au moins un antigène vaccinal,
- et, de façon optionnelle, on procède si nécessaire à une filtration supplémentaire.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/051648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/39
ADD.

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)
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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2007/052058 A1 (NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTIC [IT]; RAPPUOLI RINO [IT]; O'HAGAN DEREK) 10 May 2007 (2007-05-10) the whole document en particulier abstract page 1, line 25 - page 2, line 4 page 9, line 3 - page 14, line 8 claims 1-20; figures 1-5 ----- -/--</p>	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family 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 application or patent 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

10 September 2012

Date of mailing of the international search report

19/09/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ferreira, Roger

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/051648

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 269 821 A (KREUTER JOERG ET AL) 26 May 1981 (1981-05-26) the whole document en particulier abstract column 1, line 13 - column 2, line 37 column 3, line 3 - column 4, line 7 column 4, line 54 - column 5, line 28 claims 1, 2; examples 1-15 -----	1-11
X	WO 94/15636 A1 (CSL LTD [AU]; COX JOHN COOPER [AU]; SPARKS ROBERT EDWARD [US]; JACOBS) 21 July 1994 (1994-07-21) the whole document en particulier abstract page 4, line 1 - page 9, line 2 claims 1-22; examples 1-10; tables 1-6 -----	1-11
X	WO 2008/109852 A2 (UTI LIMITED PARTNERSHIP [CA]; SANTAMARIA PERE [CA]; MOORE ANNA [US]) 12 September 2008 (2008-09-12) the whole document en particulier abstract paragraphs [0013] - [0044] -----	1-11
X	STIENEKER F ET AL: "Comparison of 24 different adjuvants for inactivated HIV-2 split whole virus as antigen in mice. Induction of titres of binding antibodies and toxicity of the formulations", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 13, no. 1, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 45-53, XP004057700, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/0264-410X(95)80010-B the whole document -----	1-11
A	US 2005/158334 A1 (CONTORNI MARIO [IT] ET AL) 21 July 2005 (2005-07-21) the whole document -----	1-11
A	EP 1 126 876 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE] GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]) 29 August 2001 (2001-08-29) the whole document ----- -/--	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/051648

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YANNICK MATHIEU ET AL: "Control of the Morphology and Particle Size of Boehmite Nanoparticles Synthesized under Hydrothermal Conditions", LANGMUIR, vol. 23, no. 18, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 9435-9442, XP055024971, ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/la700233q cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>KWOK PAN YAU ET AL: "Aluminum hydroxide adjuvant produced under constant reactant concentration", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 95, no. 8, 1 August 2006 (2006-08-01) , pages 1822-1833, XP055024975, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.20692 the whole document</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>COIAI SERENA ET AL: "Organophilic Boehmite nanoparticles by ATRP methacrylates polymerization: synthesis, characterization and dispersion in polypropylene", JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, AMERICAN SCIENTIFIC PUBLISHERS, US, vol. 8, no. 4, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 1803-1811, XP009158586, ISSN: 1533-4880 the whole document</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>ALPHONSE ET AL: "Surface and porosity of nanocrystalline boehmite xerogels", JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 290, no. 1, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 208-219, XP005037385, ISSN: 0021-9797 the whole document</p> <p>-----</p>	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/051648

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007052058	A1	10-05-2007	AT 539765 T 15-01-2012
		AU 2006310339 A1 10-05-2007	
		CA 2628328 A1 10-05-2007	
		DK 1951299 T3 02-04-2012	
		EP 1951299 A1 06-08-2008	
		EP 2368573 A2 28-09-2011	
		ES 2377884 T3 02-04-2012	
		JP 2009514841 A 09-04-2009	
		JP 2012140470 A 26-07-2012	
		NZ 568211 A 25-11-2011	
		PT 1951299 E 28-02-2012	
		US 2009304739 A1 10-12-2009	
		WO 2007052058 A1 10-05-2007	
US 4269821	A	26-05-1981	AU 503982 B2 27-09-1979
			AU 1220876 A 22-09-1977
			DE 2611143 A1 14-10-1976
			DK 105076 A 21-09-1976
			FR 2304326 A1 15-10-1976
			GB 1544107 A 11-04-1979
			JP 1451720 C 25-07-1988
			JP 51118823 A 19-10-1976
			JP 62059088 B 09-12-1987
			NL 7602717 A 22-09-1976
			US 4225581 A 30-09-1980
			US 4269821 A 26-05-1981
WO 9415636	A1	21-07-1994	AT 218884 T 15-06-2002
			AU 667003 B2 29-02-1996
			CA 2152949 A1 21-07-1994
			DE 69332031 D1 18-07-2002
			DE 69332031 T2 19-12-2002
			EP 0678035 A1 25-10-1995
			JP 3583128 B2 27-10-2004
			JP H08505152 A 04-06-1996
			NZ 259285 A 26-07-1996
			WO 9415636 A1 21-07-1994
WO 2008109852	A2	12-09-2008	AU 2008222678 A1 12-09-2008
			CA 2680227 A1 12-09-2008
			CN 101678090 A 24-03-2010
			EP 2131856 A2 16-12-2009
			JP 2010522695 A 08-07-2010
			US 2009155292 A1 18-06-2009
			US 2011059121 A1 10-03-2011
			WO 2008109852 A2 12-09-2008
US 2005158334	A1	21-07-2005	AT 448794 T 15-12-2009
			BR 0211437 A 13-07-2004
			DK 1409013 T3 18-01-2010
			EP 2168597 A1 31-03-2010
			EP 2255827 A1 01-12-2010
			EP 2266605 A1 29-12-2010
			ES 2334495 T3 11-03-2010
			JP 4509554 B2 21-07-2010
			JP 2004538291 A 24-12-2004
			JP 2009173681 A 06-08-2009
			MX PA04000753 A 17-02-2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/051648

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		PT 1409013 E	26-02-2010	
		US 2005158334 A1	21-07-2005	
		US 2008160045 A1	03-07-2008	

EP 1126876	A2	29-08-2001	AR 020836 A1	29-05-2002
			AT 357252 T	15-04-2007
			AU 750587 B2	25-07-2002
			AU 1151800 A	08-05-2000
			BR 9915545 A	14-08-2001
			CA 2347099 A1	27-04-2000
			CA 2773698 A1	27-04-2000
			CN 1330553 A	09-01-2002
			CN 1572324 A	02-02-2005
			CN 101926993 A	29-12-2010
			CO 5210894 A1	30-10-2002
			CZ 20011341 A3	12-09-2001
			DE 69935606 T2	29-11-2007
			DE 122007000087 I1	27-03-2008
			DK 1126876 T3	02-07-2007
			EP 1126876 A2	29-08-2001
			EP 1588714 A2	26-10-2005
			EP 1666060 A1	07-06-2006
			EP 1797896 A1	20-06-2007
			EP 2266604 A2	29-12-2010
			ES 2284287 T3	01-11-2007
			HK 1038695 A1	14-09-2007
			HU 0203091 A2	28-12-2002
			IL 142395 A	01-08-2006
			JP 2003519084 A	17-06-2003
			JP 2007262097 A	11-10-2007
			JP 2012121916 A	28-06-2012
			LU 91389 I2	14-02-2008
			NL 300311 I1	01-02-2008
			NO 20011801 A	30-05-2001
			NZ 511113 A	27-09-2002
			PL 348121 A1	06-05-2002
			PT 1126876 E	30-04-2007
			SI 1126876 T1	31-08-2007
			TR 200101055 T2	21-09-2001
			TW 586936 B	11-05-2004
			US 7357936 B1	15-04-2008
			US 2008226672 A1	18-09-2008
			WO 0023105 A2	27-04-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/051648

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K39/39
ADD.

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)
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)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 2007/052058 A1 (NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTIC [IT]; RAPPUOLI RINO [IT]; O'HAGAN DEREK) 10 mai 2007 (2007-05-10) le document en entier en particulier abrégé page 1, ligne 25 - page 2, ligne 4 page 9, ligne 3 - page 14, ligne 8 revendications 1-20; figures 1-5 ----- -/--</p>	1-11



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



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

10 septembre 2012

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19/09/2012

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,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ferreira, Roger

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 4 269 821 A (KREUTER JOERG ET AL) 26 mai 1981 (1981-05-26) le document en entier en particulier abrégé colonne 1, ligne 13 - colonne 2, ligne 37 colonne 3, ligne 3 - colonne 4, ligne 7 colonne 4, ligne 54 - colonne 5, ligne 28 revendications 1, 2; exemples 1-15 -----	1-11
X	WO 94/15636 A1 (CSL LTD [AU]; COX JOHN COOPER [AU]; SPARKS ROBERT EDWARD [US]; JACOBS) 21 juillet 1994 (1994-07-21) le document en entier en particulier abrégé page 4, ligne 1 - page 9, ligne 2 revendications 1-22; exemples 1-10; tableaux 1-6 -----	1-11
X	WO 2008/109852 A2 (UTI LIMITED PARTNERSHIP [CA]; SANTAMARIA PERE [CA]; MOORE ANNA [US]) 12 septembre 2008 (2008-09-12) le document en entier en particulier abrégé alinéas [0013] - [0044] -----	1-11
X	STIENEKER F ET AL: "Comparison of 24 different adjuvants for inactivated HIV-2 split whole virus as antigen in mice. Induction of titres of binding antibodies and toxicity of the formulations", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 13, no. 1, 1 janvier 1995 (1995-01-01), pages 45-53, XP004057700, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/0264-410X(95)80010-B le document en entier -----	1-11
A	US 2005/158334 A1 (CONTORNI MARIO [IT] ET AL) 21 juillet 2005 (2005-07-21) le document en entier -----	1-11
A	EP 1 126 876 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE] GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]) 29 août 2001 (2001-08-29) le document en entier -----	1-11
	-/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>YANNICK MATHIEU ET AL: "Control of the Morphology and Particle Size of Boehmite Nanoparticles Synthesized under Hydrothermal Conditions", LANGMUIR, vol. 23, no. 18, 1 août 2007 (2007-08-01), pages 9435-9442, XP055024971, ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/la700233q cité dans la demande le document en entier</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>KWOK PAN YAU ET AL: "Aluminum hydroxide adjuvant produced under constant reactant concentration", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 95, no. 8, 1 août 2006 (2006-08-01), pages 1822-1833, XP055024975, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.20692 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>COIAI SERENA ET AL: "Organophilic Boehmite nanoparticles by ATRP methacrylates polymerization: synthesis, characterization and dispersion in polypropylene", JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, AMERICAN SCIENTIFIC PUBLISHERS, US, vol. 8, no. 4, 1 avril 2008 (2008-04-01), pages 1803-1811, XP009158586, ISSN: 1533-4880 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>ALPHONSE ET AL: "Surface and porosity of nanocrystalline boehmite xerogels", JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 290, no. 1, 1 octobre 2005 (2005-10-01), pages 208-219, XP005037385, ISSN: 0021-9797 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/051648

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2007052058	A1	10-05-2007	AT 539765 T	15-01-2012
			AU 2006310339 A1	10-05-2007
			CA 2628328 A1	10-05-2007
			DK 1951299 T3	02-04-2012
			EP 1951299 A1	06-08-2008
			EP 2368573 A2	28-09-2011
			ES 2377884 T3	02-04-2012
			JP 2009514841 A	09-04-2009
			JP 2012140470 A	26-07-2012
			NZ 568211 A	25-11-2011
			PT 1951299 E	28-02-2012
			US 2009304739 A1	10-12-2009
			WO 2007052058 A1	10-05-2007

US 4269821	A	26-05-1981	AU 503982 B2	27-09-1979
			AU 1220876 A	22-09-1977
			DE 2611143 A1	14-10-1976
			DK 105076 A	21-09-1976
			FR 2304326 A1	15-10-1976
			GB 1544107 A	11-04-1979
			JP 1451720 C	25-07-1988
			JP 51118823 A	19-10-1976
			JP 62059088 B	09-12-1987
			NL 7602717 A	22-09-1976
			US 4225581 A	30-09-1980
			US 4269821 A	26-05-1981

WO 9415636	A1	21-07-1994	AT 218884 T	15-06-2002
			AU 667003 B2	29-02-1996
			CA 2152949 A1	21-07-1994
			DE 69332031 D1	18-07-2002
			DE 69332031 T2	19-12-2002
			EP 0678035 A1	25-10-1995
			JP 3583128 B2	27-10-2004
			JP H08505152 A	04-06-1996
			NZ 259285 A	26-07-1996
			WO 9415636 A1	21-07-1994

WO 2008109852	A2	12-09-2008	AU 2008222678 A1	12-09-2008
			CA 2680227 A1	12-09-2008
			CN 101678090 A	24-03-2010
			EP 2131856 A2	16-12-2009
			JP 2010522695 A	08-07-2010
			US 2009155292 A1	18-06-2009
			US 2011059121 A1	10-03-2011
			WO 2008109852 A2	12-09-2008

US 2005158334	A1	21-07-2005	AT 448794 T	15-12-2009
			BR 0211437 A	13-07-2004
			DK 1409013 T3	18-01-2010
			EP 2168597 A1	31-03-2010
			EP 2255827 A1	01-12-2010
			EP 2266605 A1	29-12-2010
			ES 2334495 T3	11-03-2010
			JP 4509554 B2	21-07-2010
			JP 2004538291 A	24-12-2004
			JP 2009173681 A	06-08-2009
			MX PA04000753 A	17-02-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/051648

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		PT 1409013 E	26-02-2010
		US 2005158334 A1	21-07-2005
		US 2008160045 A1	03-07-2008

EP 1126876	A2	29-08-2001	AR 020836 A1 29-05-2002
			AT 357252 T 15-04-2007
			AU 750587 B2 25-07-2002
			AU 1151800 A 08-05-2000
			BR 9915545 A 14-08-2001
			CA 2347099 A1 27-04-2000
			CA 2773698 A1 27-04-2000
			CN 1330553 A 09-01-2002
			CN 1572324 A 02-02-2005
			CN 101926993 A 29-12-2010
			CO 5210894 A1 30-10-2002
			CZ 20011341 A3 12-09-2001
			DE 69935606 T2 29-11-2007
			DE 122007000087 I1 27-03-2008
			DK 1126876 T3 02-07-2007
			EP 1126876 A2 29-08-2001
			EP 1588714 A2 26-10-2005
			EP 1666060 A1 07-06-2006
			EP 1797896 A1 20-06-2007
			EP 2266604 A2 29-12-2010
			ES 2284287 T3 01-11-2007
			HK 1038695 A1 14-09-2007
			HU 0203091 A2 28-12-2002
			IL 142395 A 01-08-2006
			JP 2003519084 A 17-06-2003
			JP 2007262097 A 11-10-2007
			JP 2012121916 A 28-06-2012
			LU 91389 I2 14-02-2008
			NL 300311 I1 01-02-2008
			NO 20011801 A 30-05-2001
			NZ 511113 A 27-09-2002
			PL 348121 A1 06-05-2002
			PT 1126876 E 30-04-2007
			SI 1126876 T1 31-08-2007
			TR 200101055 T2 21-09-2001
			TW 586936 B 11-05-2004
			US 7357936 B1 15-04-2008
			US 2008226672 A1 18-09-2008
			WO 0023105 A2 27-04-2000
