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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
27 août 2020 (27.08.2020)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/169903 A1

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

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2020/050267

(22) Date de dépôt international :
13 février 2020 (13.02.2020)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1901614 18 février 2019 (18.02.2019) FR

(71) Déposant : **TOTAL MARKETING SERVICES** [FR/FR] ; 24 Cours Michelet, 92800 PUTEAUX (FR).

(72) Inventeur : **SWOBODA, Benjamin** ; 118 rue des Alluets, 78630 Orgeval (FR).

(74) Mandataire : **AUGUST DEBOUZY** ; 6 / 8 avenue de Messine, 75008 Paris (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

WO 2020/169903 A1

(54) **Title:** ADJUVANT COMPOSITION FOR A VACCINE

(54) **Titre :** COMPOSITION ADJUVANTE POUR VACCIN

(57) **Abstract:** The invention relates to an adjuvant composition for a vaccine, comprising one or more substantially isoparaffinic hydrocarbon oils having C17 and/or C18 isoparaffins, and one or more surfactants. The invention also relates to a vaccine comprising said adjuvant composition.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne une composition adjuvante pour vaccin comprenant une ou plusieurs huiles hydrocarbonées essentiellement isoparaffiniques comprenant des isoparaffines en C17 et/ou en C18, et un ou plusieurs tensioactifs. La présente invention concerne également un vaccin comprenant ladite composition adjuvante.

Description

Titre de l'invention : Composition adjuvante pour vaccin

[0001] DOMAINE DE L'INVENTION

[0002] La présente invention concerne une nouvelle composition adjuvante pour vaccin comprenant une huile hydrocarbonée majoritairement isoparaffinique et un tensioactif.

[0003] CONTEXTE TECHNIQUE DE L'INVENTION

[0004] Il existe différentes technologies de vaccins, les vaccins dit à « virus vivant » (antigènes vivants) les vaccins dit à « virus atténué » ou les vaccins dit à « virus inactivé » (antigène inactivé).

[0005] Dans les vaccins à virus vivant, il n'est pas nécessaire d'ajouter un adjuvant car ils ont déjà une efficacité suffisante. En revanche, le risque d'effets secondaires lié à ce type de vaccins est important.

[0006] A l'inverse, les vaccins à virus atténué ou inactivé ont une efficacité limitée qui requiert d'utiliser un adjuvant. Lorsque le virus atténué ou inactivé, dissous dans l'eau, est dispersé dans une huile, son efficacité est fortement augmentée. Cette dispersion, appelée émulsion, doit être stable et la plus fluide possible, stable pour avoir une bonne conservation du vaccin et fluide pour pouvoir être injectée rapidement et sans douleur. L'huile joue ainsi le rôle d'adjuvant.

[0007] L'huile de référence utilisée comme adjuvant de vaccin est une huile blanche commercialisée sous la marque Marcol™ 52, constitué de paraffines et de composés naphténiques.

[0008] Le document FR 2 922 767 divulgue l'utilisation, dans une composition adjuvante pour vaccin, de différentes huiles d'origine minérale, végétale ou animale ainsi que d'huiles synthétiques. Ce document divulgue entre autre l'huile blanche Marcol™ 52 et un isohexadécane correspondant au produit commercial Creasil® IH CG. Ces huiles sont formulées avec des tensioactifs dans des adjuvants de vaccins.

[0009] Ces huiles présentent l'inconvénient d'avoir une certaine cytotoxicité vis-à-vis des cellules immunitaires telles que les cellules mononucléées isolées du sang périphérique (CMSP), les macrophages et les cellules dendritiques.

[0010] Le document RU2072868 propose une huile comme adjuvant pour vaccin comprenant un mélange de naphtènes, de composés aromatiques et d'isoparaffines. Ce document enseigne une quantité maximale de 20% en poids d'isoparaffines pour abaisser la réactogénicité.

[0011] La nature de l'huile adjuvante peut également avoir un effet sur la réponse immunitaire du sujet traité. La présente invention vise à proposer un adjuvant de vaccin induisant une réponse immunitaire forte et une cytotoxicité la plus faible possible.

[0012] RESUME DE L'INVENTION

[0013] Ces objectifs sont atteints grâce à une nouvelle composition adjuvante.

[0014] L'invention concerne une composition adjuvante pour vaccin comprenant, par rapport au poids total de la composition adjuvante :

- au moins 40% en poids d'huile hydrocarbonée comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 90 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone ou 18 atomes de carbone et
- de 1 à 15% en poids de tensioactif(s).

[0015] Selon un mode de réalisation, lesdites isoparaffines comprennent, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 2% en poids d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou d'isoparaffines ayant 18 atomes de carbone.

[0016] Selon un mode de réalisation, l'huile hydrocarbonée comprend :

- des isoparaffines ayant 15 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 16 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 80 à 95% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée; ou
- des isoparaffines ayant 15 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 16 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 40 à 80% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée ; ou
- des isoparaffines ayant 16 atomes de carbone, des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 18 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 80 à 98% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée ; ou
- des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 18 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 80 à 98% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée.

[0017] Selon un mode de réalisation, le tensioactif est choisi parmi les tensioactifs non-ioniques, de préférence les esters de sorbitane, de préférence les esters d'acide gras de sorbitane, de préférence le tensioactif est un monooléate de sorbitane.

[0018] Selon un mode de réalisation, la composition de l'invention comprend, par rapport au poids total de la composition :

- de 60 à 98% en poids d'huile hydrocarbonée comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 95 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou 18 atomes de carbone, et

- de 2 à 10% en poids de tensioactif(s).

[0019] La présente invention concerne également un vaccin comprenant la composition adjuvante selon l'invention et au moins un antigène.

[0020] Selon un mode de réalisation, le vaccin est sous forme d'une émulsion eau dans l'huile.

[0021] Selon un mode de réalisation, le ratio massique entre la phase aqueuse et la phase grasse de l'émulsion eau-dans-l'huile va de 50/50 à 10/90, de préférence de 40/60 à 20/80 et plus préférentiellement est de 30/70.

[0022] La présente invention concerne également l'utilisation d'une composition adjuvante selon l'invention pour diminuer la cytotoxicité d'un vaccin comprenant ladite composition adjuvante.

[0023] La présente invention concerne également l'utilisation de l'huile hydrocarbonée définie selon l'invention, dans une composition adjuvante pour vaccin, pour diminuer la cytotoxicité du vaccin comprenant ladite composition adjuvante.

[0024] La présente invention concerne également l'utilisation de l'huile hydrocarbonée définie selon l'invention, dans une composition adjuvante pour vaccin, pour améliorer la stabilité du vaccin, en particulier pour un vaccin sous la forme d'une émulsion.

[0025] La composition adjuvante selon l'invention permet de disposer d'une composition pour vaccin peu cytotoxique tout en induisant une forte réponse anti-infectieuse des cellules immunitaires.

[0026] La composition adjuvante selon l'invention permet de préparer des vaccins à la fois stables et fluides.

[0027] FIGURES

[0028] [Fig. 1] Effets des huiles sur la viabilité et l'activation des CMSP, en l'absence d'une stimulation antigénique parallèle.

[0029] [Fig. 2] Effets des huiles sur la viabilité et l'activation des macrophages, en l'absence d'une stimulation antigénique parallèle.

[0030] [Fig. 3] Effets des huiles sur la viabilité et l'activation des cellules dendritiques, en l'absence d'une stimulation antigénique parallèle.

[0031] DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

[0032] L'invention concerne une composition adjuvante pour vaccin comprenant, par rapport au poids total de la composition adjuvante :

- au moins 40% en poids d'huile hydrocarbonée comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 90 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou 18 atomes de carbone et

- de 1 à 15% en poids de tensioactif(s).

[0033] A titre préliminaire on notera que, dans la description et les revendications suivantes, l'expression « compris entre » doit s'entendre comme incluant les bornes citées.

[0034] Huile hydrocarbonée

[0035] Dans le cadre de la présente invention, l'huile hydrocarbonée comprend une teneur en poids d'isoparaffines allant de 90 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée. Toujours dans le cadre de la présente invention, les isoparaffines de l'huile hydrocarbonée incluent des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou des isoparaffines ayant 18 atomes de carbone.

[0036] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huile hydrocarbonée utilisée dans la composition adjuvante comprend entre 90 et 100% en poids d'isoparaffines par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 2% en poids d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou d'isoparaffines ayant 18 atomes de carbone.

[0037] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huile hydrocarbonée de la composition adjuvante comprend une teneur en poids d'isoparaffines supérieure ou égale à 95 % et avantageusement supérieure ou égale à 98% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 2% en poids d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou d'isoparaffines ayant 18 atomes de carbone.

[0038] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huile hydrocarbonée de la composition adjuvante comprend une teneur en poids d'isoparaffines supérieure ou égale à 95 % et avantageusement supérieure ou égale à 98% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant, par rapport au poids total des

isoparaffines, au moins 20% en poids d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou d'isoparaffines ayant 18 atomes de carbone.

[0039] Selon un mode de réalisation de l'invention, les isoparaffines contenues dans l'huile hydrocarbonée incluent, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 20% en poids, de préférence au moins 30% en poids, de préférence au moins 35% en poids, de préférence au moins 40% en poids, de préférence au moins 60% en poids, de préférence au moins 80% en poids d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou d'isoparaffines ayant 18 atomes de carbone.

[0040] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huile hydrocarbonée de la composition adjuvante comprend une teneur en poids d'isoparaffines supérieure ou égale à 95 % et avantageusement supérieure ou égale à 98% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée et au moins 90%, de préférence au moins 95%, en poids desdites isoparaffines, par rapport au poids total des isoparaffines présentes dans l'huile hydrocarbonée, comportent de 12 à 30 atomes de carbone, de préférence de 13 à 19 atomes de carbone, de préférence encore de 14 à 18 atomes de carbone.

[0041] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huile hydrocarbonée comprend :

- des isoparaffines ayant 15 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 16 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 40 à 80% en poids, de préférence de 50 à 70% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée; ou

- des isoparaffines ayant 15 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 16 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 80 à 95% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée ; ou

- des isoparaffines ayant 16 atomes de carbone, des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 18 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 80 à 98% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée; ou

- des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 18 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 80 à 98% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée.

[0042] Selon un mode de réalisation de l'invention, les isoparaffines sont des isoparaffines non-cycliques.

[0043] L'huile hydrocarbonée utilisée dans la composition adjuvante selon l'invention comprend de préférence une teneur en paraffines normales inférieure ou égale à 10% en poids, préférentiellement inférieure ou égale à 5 % en poids et avantageusement inférieure ou égale à 2% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée.

[0044] Selon un mode de réalisation, l'huile hydrocarbonée selon l'invention comprend de préférence, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, une teneur en isoparaffines allant de 90 à 100% en poids et une teneur en paraffines normales allant de 0 à 10% en poids, préférentiellement de 95 à 100% en poids d'isoparaffines et de 0 à 5% en poids de paraffines normales et plus préférentiellement de 98% à 100% en poids d'isoparaffines et de 0 à 2 % en poids de paraffines normales. De manière encore plus avantageuse l'huile hydrocarbonée de la composition adjuvante selon l'invention ne contient pas de paraffines normales.

[0045] L'huile hydrocarbonée de la composition adjuvante selon l'invention comprend de préférence une teneur en composés naphténiques inférieure ou égale à 1% en poids, préférentiellement inférieure ou égale à 0,5% en poids et plus préférentiellement inférieure ou égale à 100 ppm en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée.

[0046] L'huile hydrocarbonée mise en œuvre dans la composition adjuvante selon l'invention est avantageusement exempte de composés aromatiques. Par exempte, on entend une teneur en poids de composés aromatiques inférieure ou égale à 500 ppm, de préférence inférieure ou égale à 300 ppm, préférentiellement inférieure ou égale à 100 ppm, plus préférentiellement inférieure ou égale à 50 ppm et avantageusement inférieure ou égale à 20 ppm mesurée par exemple par spectrométrie UV.

[0047] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huile hydrocarbonée comprend :

- une teneur en isoparaffines allant de 90 à 100% en poids, de préférence de 95 à 100% en poids et préférentiellement de 98% à 100% en poids par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 2% en poids et préférentiellement au moins 20% en poids, d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou d'isoparaffines ayant 18 atomes de carbone,

- une teneur en paraffines normales inférieure ou égale à 10% en poids, de préférence inférieure ou égale à 5% en poids et préférentiellement inférieure ou égale à 2% en poids par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée ; et/ou

- une teneur en composés naphténiques inférieure ou égale à 1% en poids, de préférence inférieure ou égale à 0,5% en poids et préférentiellement inférieure ou égale à 100 ppm par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée ; et/ou

- une teneur en poids de composés aromatiques inférieure ou égale à 500 ppm, de préférence inférieure ou égale à 300 ppm, préférentiellement inférieure ou égale à 100

ppm, plus préférentiellement inférieure ou égale à 50 ppm et avantageusement inférieure ou égale à 20 ppm, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée.

[0048] Les teneurs en poids en isoparaffines, en paraffines normales, en naphtènes et en aromatiques de l'huile hydrocarbonée peuvent être déterminées selon des méthodes bien connues de l'homme du métier. On peut citer à titre d'exemple non limitatif, une méthode par chromatographie en phase gazeuse.

[0049] L'huile hydrocarbonée mise en œuvre dans la composition adjuvante selon l'invention a également de préférence une teneur en poids de composés soufrés extrêmement basse, typiquement inférieure ou égale à 5 ppm, préférentiellement inférieure ou égale à 3 ppm et plus préférentiellement inférieure ou égale à 0,5 ppm, c'est-à-dire à un niveau trop bas pour être détectée grâce à des analyseurs de basse-teneur en soufre conventionnels.

[0050] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huile hydrocarbonée a une température d'ébullition allant de 230 à 340°C, de préférence de 235 à 330°C et plus préférentiellement de 240 à 325°C selon la norme ASTM D86.

[0051] Selon un mode de réalisation de l'invention, la différence entre le point final d'ébullition et le point initial d'ébullition selon la norme ASTM D86 de l'huile hydrocarbonée est inférieure à 80°C, de préférence inférieure à 60°C, et plus préférentiellement inférieure à 40°C.

[0052] L'huile hydrocarbonée mise en œuvre dans la composition adjuvante selon l'invention a également de préférence un point éclair supérieur ou égal à 110°C, préférentiellement supérieur ou égal à 120°C et plus préférentiellement supérieur ou égal à 140°C selon la norme EN ISO 2719. Un point éclair élevé, typiquement supérieure à 110°C permettant entre autre de pallier les problèmes de sécurité lors du stockage et du transport en évitant une inflammabilité trop sensible de l'huile hydrocarbonée.

[0053] L'huile hydrocarbonée a aussi de préférence une pression de vapeur à 20°C inférieure ou égale à 0,01kPa.

[0054] Selon un mode de réalisation, l'huile hydrocarbonée mise en œuvre dans la composition adjuvante selon l'invention a un point éclair supérieur ou égal à 110°C selon la norme EN ISO 2719 et une pression de vapeur à 20°C inférieure ou égale à 0,01kPa. Préférentiellement l'huile hydrocarbonée a un point éclair supérieur ou égal à 120°C et une pression de vapeur à 20°C inférieure ou égale à 0,01kPa. Et plus préférentiellement,

elle a un point éclair supérieur ou égal à 140°C et une pression de vapeur à 20°C inférieure ou égale à 0,01kPa.

[0055] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huile hydrocarbonée est d'origine biologique et présente typiquement une teneur en biomatériau d'au moins 90% en poids par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée. Cette teneur est avantageusement plus élevée, en particulier supérieure ou égale à 95% en poids, de préférence supérieure ou égale à 98 % en poids et avantageusement égale à 100%. La détermination de la teneur en biomatériau ou en bio-carbone est donnée conformément aux normes ASTM D 6866-12, la méthode B (ASTM D 6866-06) et ASTM D 7026 (ASTM D 7026-04).

[0056] L'huile hydrocarbonée de la composition adjuvante selon l'invention a en outre de préférence une viscosité cinématique à 40°C inférieure ou égale à 5 cSt, préférentiellement inférieure ou égale à 4 cSt et plus préférentiellement inférieure ou égale à 3 cSt selon la norme EN ISO 3104.

[0057] Le terme de « bio-carbone » indique que le carbone est d'origine naturelle et vient d'un biomatériau, comme indiqué ci-après. La teneur en bio-carbone et la teneur en biomatériau sont des expressions indiquant la même valeur. Un matériau d'origine renouvelable ou biomatériau est un matériau organique dans lequel le carbone est issu du CO_2 fixé récemment (sur une échelle humaine) par photosynthèse à partir de l'atmosphère. Un biomatériau (Carbone 100% d'origine naturelle) présente un rapport isotopique $^{14}C/^{12}C$ supérieur à 10^{-12}, typiquement environ $1,2 \times 10^{-12}$, tandis qu'un matériau fossile a un rapport nul. En effet, le ^{14}C isotopique est formé dans l'atmosphère et est alors intégré par photosynthèse, selon une échelle de temps de quelques dizaines d'années au maximum. La demi-vie du ^{14}C est 5730 années. Ainsi, les matériaux issus de la photosynthèse, à savoir les plantes d'une manière générale, ont nécessairement un contenu maximum en isotope ^{14}C.

[0058] Selon un mode de réalisation de l'invention, l'huile hydrocarbonée a une biodégradabilité à 28 jours d'au moins 60%, de préférence d'au moins 70%, préférentiellement d'au moins 75% et encore plus préférentiellement d'au moins 80% mesurée selon la norme OECD 306.

[0059] Selon un mode particulier de réalisation, l'huile hydrocarbonée a :

- une température d'ébullition allant de 230 à 340°C, de préférence de 235 à 330°C et plus préférentiellement de 240 à 325°C selon la norme ASTM D86 ; et/ou

- une différence entre le point final d'ébullition et le point initial d'ébullition selon la norme ASTM D86 de l'huile hydrocarbonée inférieure à 80°C, de préférence inférieure à 60°C, et plus préférentiellement inférieure à 40°C, et/ou

- une biodégradabilité à 28 jours d'au moins 60%, de préférence d'au moins 70%, préférentiellement d'au moins 75% et encore plus préférentiellement d'au moins 80% mesurée selon la norme OCDE 306 ; et/ou

- un point éclair supérieur ou égal à 110°C selon la norme EN ISO 2719.

[0060] Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'huile hydrocarbonée de la composition adjuvante présente un intervalle d'ébullition (mesuré selon la norme ASTM D86) dans la gamme allant de 235 à 330°C et plus préférentiellement de 240 à 325°C, et comprend une teneur en poids d'isoparaffines supérieure ou égale à 95 % et avantageusement supérieure ou égale à 98% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 2% en poids, de préférence au moins 20% en poids, d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou d'isoparaffines ayant 18 atomes de carbone.

[0061] Procédé d'obtention de l'huile hydrocarbonée

[0062] L'huile hydrocarbonée selon l'invention peut être une coupe hydrocarbonée issue par exemple de la conversion de la biomasse. Par issue de la conversion de la biomasse, on entend une coupe hydrocarbonée produite à partir de matières premières d'origine biologique.

[0063] De préférence, la coupe hydrocarbonée d'origine biologique est obtenue par un procédé comprenant des étapes d'hydrodésoxygénation (HDO) et d'isomérisation (ISO). L'étape d'hydrodésoxygénation (HDO) conduit à la décomposition des structures des esters biologiques ou des constituants triglycérides, à l'élimination des composés oxygénés, phosphorés et soufrés et à l'hydrogénation des liaisons oléfiniques. Le produit issu de la réaction d'hydrodésoxygénation est ensuite isomérisé. Une étape de fractionnement peut de préférence suivre les étapes d'hydrodésoxygénation et d'isomérisation. De manière avantageuse, les fractions d'intérêt sont ensuite soumises à des étapes d'hydrotraitement puis de distillation afin obtenir les spécifications de l'huile hydrocarbonée souhaitée selon l'invention.

[0064] Ce procédé HDO/ISO est mis en œuvre sur une charge biologique brute, encore appelée biomasse ou matière première d'origine biologique, sélectionnée dans le groupe consistant en des huiles végétales, des graisses animales, des huiles de poisson et leur

mélange. Les matières premières d'origine biologique appropriées sont par exemple l'huile de colza, l'huile de canola, le talloil, l'huile de tournesol, l'huile de soja, l'huile de chanvre, l'huile d'olive, l'huile de lin, l'huile de moutarde, l'huile de palme, l'huile d'arachide, l'huile de ricin, l'huile de noix de coco, les graisses animales telles que le suif, les graisses alimentaires recyclées, les matières premières issues du génie génétique, et les matières premières biologiques produites à partir de microorganismes tels que les algues et les bactéries. Des produits de condensation, esters ou autres dérivés obtenus à partir de matériaux biologiques bruts peuvent également servir de matières premières.

[0065] De préférence, la matière première d'origine biologique est un ester ou un dérivé triglycéride. Ce matériau est soumis tout d'abord à une étape d'hydrodésoxygénation (HDO) pour décomposer la structure des esters ou triglycérides constitutifs et éliminer les composés oxygénés, phosphorés et soufrés de manière concomitante à l'hydrogénation des liaisons oléfiniques. Cette étape d'hydrodésoxygénation (HDO) de la matière première d'origine biologique est suivie par une isomérisation du produit ainsi obtenu conduisant à la ramification de la chaîne hydrocarbonée et à une amélioration des propriétés de la paraffine à basses températures.

[0066] Durant l'étape HDO, l'hydrogène et la matière première d'origine biologique sont passés sur un lit catalytique d'hydrodésoxygénation de manière simultanée ou à contre-courant. Durant l'étape HDO, la pression et la température sont comprises entre 20 et 150 bars et entre 200 et 500°C respectivement. Des catalyseurs classiques et connus d'hydrodésoxygénation sont utilisés durant cette étape. Éventuellement, la matière première d'origine biologique peut être soumise à une préhydrogénation sous conditions douces pour éviter les réactions secondaires des doubles liaisons avant l'étape HDO. Après l'étape d'hydrodésoxygénation, le produit issu de la réaction est soumis à une étape d'isomérisation (ISO) où l'hydrogène et le produit, et éventuellement un mélange de n- paraffines, sont passés sur des lits catalytiques d'isomérisation de manière simultanée ou à contre- courant. Lors de l'étape ISO, la pression et la température sont comprises entre 20 et 150 bars et entre 200 et 500°C respectivement. Des catalyseurs classiques et connus d'isomérisation sont utilisés durant cette étape.

[0067] Divers procédés HDO/ISO sont décrits dans la littérature. La demande WO 2014/033762 décrit un procédé comprenant une étape de pré-hydrogénation, une étape d'hydrodésoxygénation (HDO) et une étape d'isomérisation opérées à contre-courant. La demande de brevet EP 1728844 décrit un procédé de production de composés hydrocarbonés à partir d'un mélange de composés d'origine végétale et animale.

[0068] Des procédés secondaires additionnels peuvent également être mis en œuvre (comme des mélanges intermédiaires, des piégeages ou autres procédés de la sorte).

[0069] La composition adjuvante selon l'invention comprend de préférence une teneur en huile hydrocarbonée allant de 40 à 99% en poids, préférentiellement de 60 à 98% en poids et plus préférentiellement de 85 à 96% en poids par rapport au poids total de la composition adjuvante.

[0070] Tensioactif :

[0071] La composition adjuvante selon l'invention constitue une phase grasse qui, pour former un vaccin, peut être mélangée avec une phase aqueuse comprenant un antigène. Le tensioactif présent dans la composition adjuvante permet de mélanger la phase grasse et la phase aqueuse qui sont non-miscibles afin d'obtenir un mélange homogène et stable.

[0072] Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante comprend entre 2 et 10% en poids de tensioactif, de préférence entre 4 et 8% en poids, de préférence environ 6% en poids de tensioactif, par rapport au poids total de la composition adjuvante.

[0073] Par tensioactif, on entend un ou plusieurs tensioactifs.

[0074] Les tensioactifs qui peuvent être utilisés dans l'invention sont des tensioactifs qui sont disponibles commercialement et accessibles à l'homme du métier. Ce sont typiquement des tensioactifs pharmaceutiquement acceptables, en particulier compatibles pour une administration chez les êtres humains et les animaux.

[0075] Selon un mode de réalisation de l'invention, le tensioactif contenu dans la composition adjuvante est un tensioactif non-ionique.

[0076] Selon un mode de réalisation de l'invention, le tensioactif contenu dans la composition adjuvante est choisi parmi les esters de sorbitane, les esters de sorbitane polyéthoxylés, les esters de mannitane, les esters de mannitane polyéthoxylés de préférence parmi les esters de sorbitane.

[0077] Selon un mode de réalisation de l'invention, le tensioactif contenu dans la composition adjuvante est un ester d'acide gras de sorbitane choisi parmi l'oléate de sorbitane, le stéarate de sorbitane, le palmitate de sorbitane, le laurate de sorbitane. De préférence, le tensioactif est un monooléate de sorbitane. Un exemple non limitatif de tensioactif pouvant être utilisé dans la composition adjuvante selon l'invention est le SPAN® 80 commercialisé par Croda.

[0078] Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le tensioactif contenu dans la composition adjuvante est choisi parmi les lécithines, les alcanols polyéthoxylés, les esters de polyéthylèneglycol, les polyhydroxystéarates de polyglycol ou de polyglycérol.

[0079] Composition adjuvante selon l'invention

[0080] La composition adjuvante selon l'invention comprend au moins une huile hydrocarbonée telle que définie ci-dessus et au moins un tensioactif.

[0081] Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante est constituée d'une ou plusieurs huiles hydrocarbonées telles que définies ci-dessus et d'un ou plusieurs tensioactifs.

[0082] Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante comprend au moins une autre huile différente de l'huile hydrocarbonée définie dans la présente invention. De préférence, selon ce mode de réalisation, la composition adjuvante comprend de 1 à 40% en poids, de préférence de 5 à 30% en poids, voire de 10 à 20% en poids d'une autre huile, par rapport au poids total de la composition adjuvante.

[0083] Parmi les autres huiles, on peut citer les huiles minérales, végétales ou animales. En particulier, l'autre huile peut être une huile hydrocarbonée d'origine fossile ou renouvelable ou une huile végétale hydrogénée ou non.

[0084] Selon un mode de réalisation, la composition adjuvante selon l'invention comprend une autre huile choisie parmi les n-paraffines, typiquement parmi les n-paraffines comprenant de 12 à 40 atomes de carbone, de préférence de 14 à 30 atomes de carbone, voire de 16 à 24 atomes de carbone. Les n-paraffines peuvent être choisies parmi les n-paraffines biosourcées. Ces n-paraffines peuvent être disponibles commercialement.

[0085] Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante pour vaccin consiste en, par rapport au poids total de la composition adjuvante :

- au moins 40% en poids d'huile(s) hydrocarbonée(s) comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 90 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 20% en poids d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone ou 18 atomes de carbone,

- de 1 à 15% en poids de tensioactif(s) et

- de 1 à 40% en poids d'une ou plusieurs autres huiles.

[0086] Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante pour vaccin comprend, de préférence consiste en, par rapport au poids total de la composition adjuvante :

- au moins 40% en poids d'huile(s) hydrocarbonée(s) comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 90 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 20% en poids d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone ou 18 atomes de carbone,

- de 1 à 15% en poids de tensioactif(s) et

- de 1 à 40% en poids d'une ou plusieurs autres huiles choisies parmi les n-paraffines.

[0087] Selon un mode de réalisation, la composition adjuvante pour vaccin selon l'invention comprend un ratio massique huile(s) hydrocarbonée(s) définie(s) dans l'invention / n-paraffine(s) allant de 60/40 à 99/1, de préférence de 70/30 à 98/2, voire de 80/20 à 95/5.

[0088] Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante ne comprend pas d'huile différente de l'huile hydrocarbonée définie dans la présente invention.

[0089] Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante pour vaccin consiste en, par rapport au poids total de la composition adjuvante :

- au moins 40% en poids d'huile(s) hydrocarbonée(s) comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 90 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 2% en poids, de préférence au moins 20% en poids d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone ou 18 atomes de carbone et

- de 1 à 15% en poids d'esters de sorbitane, de préférence de monooléate de sorbitane.

[0090] La composition adjuvante peut également comprendre d'autres agents comme par exemple des sels métalliques, de préférence des sels d'aluminium, de préférence en une quantité allant de 0,1 à 5% en poids par rapport au poids total de la composition adjuvante. Ces sels métalliques permettent d'augmenter la viscosité de la composition adjuvante et d'améliorer la stabilité de l'émulsion.

[0091] Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante pour vaccin comprend, voire consiste en, par rapport au poids total de la composition adjuvante :

- au moins 40% en poids d'huile(s) hydrocarbonée(s) comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 90 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée,

lesdites isoparaffines incluant des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone ou 18 atomes de carbone

- de 1 à 15% en poids de tensioactif(s) et

- éventuellement de 0,1 à 5% en poids de sels métalliques, de préférence de sels d'aluminium,

- éventuellement de 1 à 40% en poids d'une ou plusieurs autres huiles.

[0092] Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante pour vaccin comprend, voire consiste en, par rapport au poids total de la composition adjuvante :

- au moins 40% en poids d'huile(s) hydrocarbonée(s) comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 90 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone ou 18 atomes de carbone

- de 1 à 15% en poids de tensioactif(s) et

- éventuellement de 0,1 à 5% en poids de sels métalliques, de préférence de sels d'aluminium,

- éventuellement de 1 à 40% en poids d'une ou plusieurs autres huiles choisies par exemple parmi les n-paraffines.

[0093] Selon un autre mode de réalisation, la composition adjuvante comprend en outre un conservateur, par exemple un parabène, de préférence méthylparabène, éthylparabène et/ou propylparabène.

[0094] Selon un autre mode de réalisation, la composition adjuvante pour vaccin ne comprend pas de sels métalliques.

[0095] Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition adjuvante ne comprend pas de polymère.

[0096] Vaccin préparé à partir de la composition adjuvante selon l'invention

[0097] La composition adjuvante selon l'invention est utile pour préparer un vaccin.

[0098] Selon un mode de réalisation, le vaccin est sous la forme d'une émulsion, dans laquelle la composition adjuvante de l'invention constitue la phase grasse.

[0099] Selon un mode de réalisation particulier, le vaccin selon l'invention ne comprend pas de phase grasse différente de la composition adjuvante selon l'invention.

[0100] Selon un mode de réalisation, le vaccin est sous la forme d'une émulsion, dans laquelle la phase aqueuse comprend de l'eau, un antigène et un tensioactif.

[0101] Le tensioactif contenu dans la phase aqueuse peut être identique ou différent du tensioactif contenu dans la composition adjuvante constituant la phase grasse. Selon un mode de réalisation de l'invention, le tensioactif contenu dans la phase aqueuse est choisi parmi les tensioactifs non-ioniques, de préférence parmi les esters de sorbitane, les esters de sorbitane polyéthoxylés, les esters mannitane, les esters de mannitane polyéthoxylés de préférence parmi les esters de sorbitane.

[0102] Selon un mode de réalisation de l'invention, le tensioactif contenu dans la phase aqueuse est un ester d'acide gras de sorbitane choisi parmi l'oléate de sorbitane, le stéarate de sorbitane, le palmitate de sorbitane, le laurate de sorbitane. De préférence, le tensioactif est un ester de sorbitan polyéthoxylé. Un exemple non limitatif de tensioactif pouvant être utilisé dans la phase aqueuse du vaccin selon l'invention est le Tween® 80 commercialisé par Croda.

[0103] Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le tensioactif contenu dans la phase aqueuse est choisi parmi les lécithines, les alcanols polyéthoxylés, les esters de polyéthylèneglycol, les polyhydroxystéarates de polyglycol ou de polyglycérol.

[0104] Selon un mode de réalisation, le vaccin est sous la forme d'une émulsion eau-dans-l'huile.

[0105] Selon un mode de réalisation, le vaccin est sous la forme d'une émulsion dans laquelle le ratio massique entre la phase aqueuse et la phase grasse va de 50/50 à 10/90, de préférence de 40/60 à 20/80 et plus préférentiellement est de 30/70.

[0106] Typiquement, le vaccin selon l'invention a une viscosité dynamique à 25°C comprise entre 10 et 150 mPa.s, de préférence entre 15 et 120 mPa.s, de préférence entre 20 et 100 mPa.s mesurée selon la norme ASTM D445.

[0107] Selon un mode de réalisation, le vaccin est préparé par mise en contact de la composition adjuvante selon l'invention avec une solution aqueuse comprenant un antigène. On entend par antigène toute substance que le système immunologique d'un individu reconnaît comme étrangère, et qui provoque une réponse par la production d'anticorps. Les antigènes sont généralement des polysaccharides, des dérivés de polysaccharide, des protéines ou des dérivés de protéine.

[0108] Selon un mode de réalisation, l'antigène présent dans le vaccin est choisi parmi un anti-virus *Foot and Mouth Disease*, un anti-bacteria Pasteurella, un antigène Newcastle, un antigène Avian Influenza.

[0109] Selon un mode de réalisation particulier, le vaccin est préparé par mise en contact de la composition adjuvante selon l'invention avec une phase aqueuse comprenant un antigène et un tensioactif.

[0110] Les inventeurs ont découvert que l'huile hydrocarbonée selon l'invention permet d'améliorer l'effet anti-infectieux d'un antigène.

[0111] La présente invention concerne ainsi l'utilisation de l'huile hydrocarbonée définie dans la présente invention, dans une composition adjuvante, pour améliorer l'effet anti-infectieux de ladite composition adjuvante pour vaccin. La composition adjuvante, dans le cadre de l'utilisation, présentera de préférence une ou plusieurs des caractéristiques définies ci-dessus pour la composition adjuvante selon l'invention.

[0112] La présente invention concerne également l'utilisation de l'huile hydrocarbonée selon l'invention, dans une composition adjuvante pour vaccin, pour diminuer la cytotoxicité du vaccin.

[0113] La présente invention concerne également l'utilisation de l'huile hydrocarbonée définie dans la présente l'invention, dans une composition adjuvante pour vaccin, pour améliorer la stabilité du vaccin, en particulier pour un vaccin sous la forme d'une émulsion.

[0114] EXEMPLES

[0115] Dans la suite de la présente description, des exemples sont donnés à titre illustratif de la présente invention et ne visent en aucun cas à en limiter la portée.

[0116] Exemple 1 : évaluation des effets immunologiques

[0117] Le tableau 1 ci-dessous regroupe les propriétés physico chimiques de deux huiles hydrocarbonées utilisables dans des compositions adjuvantes selon l'invention.

[0118] [Tableau 1]

Caractéristiques	Huile A	Huile B
Aromatiques (ppm)	<20	<20
Soufre (ppm)	0.1	0,11
% iso paraffines (w/w)	95.1	96,2
% n-paraffines (w/w)	4.9	3,8
% naphténiques (w/w)	0	0
C13 (iso)	0	0

C14 (iso)	0.12	0
C15 (iso)	11.45	0
C16 (iso)	47.89	1,58
C17 (iso)	18.57	14,17
C18 (iso)	17.07	79,69
C19 (iso)	0	0,12
C20 (iso)	0	0,38
C27 (iso)	0	0,29
Quantité de carbones d'origine biologique (%)	>97	> 98
Point d'ébullition initial (°C)	259.5	293,6
Point ébullition 5% (°C)	270.2	296,7
Point ébullition 50% (°C)	274.5	298,5
Point ébullition 95% (°C)	286.4	305,3
Point d'ébullition final (°C)	287.5	324,1
Biodégradabilité OCDE (28 jours) (%)	83	83
Indice de réfraction à 25°C	1,4357	1,4394
densité à 15°C (kg/m3)	780.3	787,2
Point éclair (°C)	125	149
Viscosité Cinématique à 40°C (cSt)	2.94	3,87
Pression de vapeur à 20°C (kPa)	<0.01	<0,01
Point d'Aniline (°C)	91	93,2

[0119] Les normes et méthodes suivantes ont été utilisées pour mesurer les propriétés ci-dessus :

- point éclair : EN ISO 2719
- densité à 15°C : EN ISO 1185
- viscosité à 40°C : EN ISO 3104
- point d'aniline : EN ISO 2977
- Point d'ébullition : ASTM D86
- biodégradabilité : méthode OCDE 306
- indice de réfraction à 20°C : ASTM D 1218

- pression de vapeur : calculée selon des méthodes bien connues de l'homme du métier.

[0120] Exemple 2 : évaluation de l'effet immunologique des Huiles de l'Exemple 1

[0121] Les Huiles A et B décrites dans l'Exemple 1 ont été testées *in vitro* pour déterminer leurs effets immunologiques sur des cellules immunitaires humaines.

[0122] Les effets immunologiques des huiles selon l'invention ont été comparés à ceux d'adjuvants de référence, en particulier des huiles hydrocarbonées, Marcol™ 52 et Creasil IH CG, cette dernière étant une huile isoparaffinique. Les effets des huiles ont également été comparés à ceux de l'hydroxyde d'aluminium, un adjuvant de référence utilisée dans de nombreux vaccins commerciaux.

[0123] Différents tests ont été effectués sur des cellules immunitaires humaines. Le premier test a été fait sur les cellules mononucléées isolées du sang périphérique (CMSP) de donneurs sains. D'autres tests ont ensuite été faits sur des macrophages et des cellules dendritiques obtenus en séparant les populations lymphocytaire et monocytaire des CMSP et en différenciant les monocytes in vitro en macrophages ou en cellules dendritiques sous l'effet de cytokines (GM-CSF & M-CSF ou interleukine(IL)-4). Ces modèles cellulaires sont bien décrits dans la littérature scientifique, en particulier pour caractériser les effets immunologiques de candidats vaccins et de leurs constituants tels que leurs adjuvants.

[0124] Les CMSP, les macrophages et les cellules dendritiques ont été mis en contact pendant 24 heures avec les huiles selon l'invention ainsi qu'avec des adjuvants de référence. La capacité des cellules à se multiplier, à mourir et à se différencier a été mesurée en dosant l'activation cellulaire, la viabilité cellulaire, le profil de cytokines et l'expression membranaire d'autres biomarqueurs.

[0125] Préparation de microplaques de culture : 24 heures avant l'incubation avec les huiles, les cellules sont ensemencées dans des microplaques 96 puits (Corning). Les microplaques sont ensuite placées à l'incubateur à 37°C.

[0126] Incubation des cellules avec les huiles : la durée d'incubation était de 15 minutes. Après ces temps d'incubation, les microplaques sont vidées et les cellules sont rincées.

[0127] Mesure de l'activation et de la viabilité cellulaire : 3 jours après le traitement par les huiles, les cellules sont observées au microscope pour évaluer l'activation cellulaire puis soumises à un test colorimétrique au sel de méthyl de tétrazolium (MTT) pour évaluer la viabilité cellulaire.

[0128] Dosage des cytokines : 5 jours après le traitement par les huiles, des dosages immunoenzymatiques multiplexés sont réalisés et des immunophénotypages sont analysés par cytométrie en flux afin de déterminer le profil des cytokines et l'expression membranaire des cellules.

[0129] Les effets ont été mesurés vis-à-vis de 2 ou 3 donneurs, en triplicat de culture. Les résultats des tests sont présentés dans les Tableaux 2 à 10 ci-dessous.

[0130] Les résultats des observations relatives à l'activation et la viabilité cellulaire à différentes dilutions (les dilutions sont exprimées en % volumique) sont présentés aux Figures 1 à 3. On observe une activation cellulaire significative pour les Huiles A et B avec une augmentation plus forte pour l'Huile A que pour l'Huile B.

[0131] Dans ces conditions expérimentales, le Marcol™ 52 et le Creasil® IH CG présentent le même profil puisqu'ils diminuent la viabilité des CMSP, des macrophages et des cellules dendritiques provenant des différents donneurs de cellules. Le Marcol™ 52 et le Creasil® IH CG présentent une cytotoxicité aux faibles dilutions (dilutions exprimées en % volumique), c'est-à-dire aux fortes concentrations. En revanche, les Huiles A et B, tout comme l'hydroxyde d'aluminium, n'engendrent pas de diminution de la viabilité cellulaire. Contrairement au Marcol™ 52 et au Creasil® IH CG, les Huiles A et B ne montrent aucune cytotoxicité aux concentrations testées.

[0132] Le profil de cytokines des CMSP est observé après stimulation antigénique ou non soit à l'aide de la Toxine Tétanique (TT), soit de la tuberculine (PPD).

[0133] Le Tableau 2, ci-dessous, rassemble les résultats des dosages des cytokines après 5 jours dans les surnageants de cultures de CMSP non exposées en parallèle à un antigène. Les résultats sont exprimés en pg/mL.

[0134] [Tableau 2]

	Dilution	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12	IL-13	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α
Témoin		4 978	14	185	48	3	2 003	227	750	71 445
Hydroxyde d'aluminium		4 104	6	33	53	1	645	121	538	9 262
Huile A	4	3 842	12	65	71	3	2 052	188	992	41 643
	20	4 043	9	35	24	2	1 175	130	515	25 561
	100	3 991	11	72	28	2	1 698	155	382	35 206
Marcol™ 52	20	3 852	6	14	7	1	348	16	72	15 851
	100	4 886	14	181	1	3	1 896	227	1 445	69 664

	500	5 067	14	294	68	2	2 773	283	1 192	71 217
Creasil® IH CG	50	4 662	1	2	3	0	7	3	13	1 987
	250	4 807	12	155	41	3	2 312	266	1 091	40 023
	1250	4 535	14	211	55	3	2 200	286	1 107	70 288
Huile B	4	3 708	13	63	43	2	1 089	140	789	64 724
	20	4 761	13	99	36	3	1 673	202	1 242	75 070
	100	5 240	14	133	50	2	1 734	190	1 323	75 138

Profil de cytokines des CMSP

[0135] Sans stimulation antigénique des CMSP, des modulations sont observées au niveau de la production cytokinique en présence des différents adjuvants testés. Dans ces conditions expérimentales, l'Huile A se distingue des autres adjuvants par une diminution plus prononcée du taux d'IL-5, une diminution de celui du TNF-α et une absence d'augmentation d'IFN-γ.

[0136] Le profil des cytokines des macrophages et des cellules dendritiques a été évalué lors de réactions lymphocytaires mixtes (MLR).

[0137] Macrophages

[0138] Le Tableau 3, ci-dessous, compare les effets des adjuvants sur la prolifération lymphocytaire en réponse aux interactions avec les macrophages, sous antigène (PPD) ou non. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules non-traitées (Témoin).

[0139] [Tableau 3]

		Sans PPD		**Avec PPD**	
	% ou Dilution	Moyenne	Ecart-Type.	Moyenne	Ecart-Type.
Témoin		100	12	100	12
Hydroxyde d'aluminium	10%	74	7	63	7
	2%	68	6	61	12
Huile A	4	109	14	121	11
	20	145	7	110	13
	100	131	5	119	5
Marcol™ 52	20	108	9	78	8
	100	102	7	48	7

	500	103	6	88	8
Creasil® IH CG	50	107	7	98	6
	250	116	6	98	5
	1250	107	6	103	4
Huile B	4	100	2	98	11
	20	171	7	136	17
	100	135	4	123	6

Profil de cytokines des macrophages avec et sans présentation antigènique (PPD) préalable

[0140] Le Tableau 4, ci-dessous, détaille les effets des adjuvants sur les taux cytokiniques dans les surnageants de culture des macrophages cocultivés avec les lymphocytes autologues et sans présentation antigénique (PPD) préalable.

[0141] [Tableau 4]

	% ou Dilution	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12	IL-13	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α
NT		24	0	1	3	0,01	1	1	1	442
Hydroxyde d'aluminium	10	9	0	0,56	3	0,01	0	1	1	341
Huile A	4	37	0	0,04	7	0	1	2	1	1 331
	20	37	1	0,56	5	0,26	0	3	1	2 222
	100	25	0	0,56	4	0,01	0	1	1	1 091
Marcol™ 52	20	10	0	0,04	2	0	0,14	0	0,68	295
	100	7	0	0,31	1	0	0	0,21	0,31	227
	500	15	0	0,04	4	0,26	0,14	1	0,31	416
Creasil® IH CG	50	22,5	0,11	0,04	4	0	0	1	0,68	802
	250	18	0,11	0	3	0	0	1	0,31	612
	1250	15	0,11	0,56	4	0	0,14	0,38	1	564
Huile B	4	16	0,11	0,81	6	0	0,14	1	0,68	659
	20	21	0	0,04	4	0,14	0	1	0,68	1 121
	100	20	0	0	4	0	0	1	0,68	579

[0142] Le Tableau 5, ci-dessous, détaille les effets des adjuvants sur les taux cytokiniques dans les surnageants de culture des macrophages cocultivés avec les lymphocytes autologues et après présentation antigénique (PPD).

[0143] [Tableau 5]

	% ou Dilution	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12	IL-13	GM-CSF	IFN-γ	TNF-α
NT		18	0	2	4	0	1	1	1	235
PPD		297	6	12	16	0	41	144	20	15 356
Hydroxyde d'aluminium	10	462	11	28	24	3	117	777	43	63 154
Huile A	4	690	19	59	36	3	132	999	62	66 323
	20	539	15	37	39	2	15	522	12	43 879
	100	613	16	40	39	3	56	604	21	49 185
Marcol™ 52	20	328	7	11	1	1	15	128	15	13 816
	100	357	8	18	13	1	38	219	31	19 957
	500	411	10	2	17	1	59	236	28	20 938
Creasil® IH CG	50	505	12	30	26	1,5	79	435	31	32 987
	250	544	14	31	24	1,5	69	385	31	32 601
	1250	512	13	27	22	2	70	373	31	32 061
Huile B	4	566	14	40	36	2	326	492	87	36 840
	20	454	11	21	16	1,5	37	252	28	23 104
	100	492	11	22	20	1	96	273	21	25 019

[0144] Les résultats des dosages cytokiniques indiquent que la présence de l'Huile A engendre une production accrue d'IL-2, d'IL-10, d'IL-12 et de TNF-α. Ces résultats suggèrent une réponse Th1, cellulaire, favorisée par rapport à un profil Th2. La présence d'IL-12 oriente la différenciation des lymphocytes T naïfs vers des lymphocytes de profil Th1. Toutefois, la détection de cytokines comme l'IL-4 et l'L-13 témoigne d'un profil mixte Th1 et Th2 ou d'une régulation entre les deux profils. La forte production de GM-CSF par les Huiles A et B est aussi un élément pouvant accélérer une réponse microbienne. En effet, le GM-CSF, aux niveaux central et périphérique, augmente le nombre ou la fonctionnalité des cellules de la lignée monocyto/macrophagique, potentialisant ainsi les réponses anti-infectieuses.

[0145] Cellules dendritiques

[0146] Le Tableau 6, ci-dessous, compare les effets des adjuvants sur la prolifération lymphocytaire en réponse aux interactions avec les cellules dendritiques, sous antigène (PPD) ou non. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules non-traitées (Témoin).

[0147] [Tableau 6]

		Sans PPD		Avec PPD	
	% ou Dilution	Moy.	ET.	Moy.	ET.
Témoin		100	4	100	9
Hydroxyde d'aluminium	10%	57	28	69	1
	2%	96	12	106	5
Huile A	4	128	5	131	11
	20	135	2	147	8
	100	138	6	138	7
Marcol™ 52	20	114	4	137	5
	100	114	2	124	5
	500	118	13	114	4
Creasil® IH CG	50	96	41	107	2
	250	128	3	141	14
	1250	108	1	116	5
Huile B	4	79	3	87	4
	20	161	0	177	2
	100	124	2	134	2

[0148] Le Tableau 7 détaille les effets des adjuvants sur les taux cytokiniques dans les surnageants de culture des cellules dendritiques cocultivées avec les lymphocytes autologues et sans présentation antigénique (PPD) préalable.

[0149] [Tableau 7]

	% ou Dilution	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12	IL-13	GM-CSF	IFN-g	TNF-a
NT		37	0,1	0,6	5,5	0	7,5	2,5	1	477
Hydroxyde d'aluminium	10	45	0,1	1	8	0	10	3	1	649
Huile A	4	51	0,5	1	7	0,1	12	8	5	1 354
	20	31	0,1	0,6	5	0	2,5	9	4	1 417
	100	37	0,1	1	6	0	6	7	3	1 059
Marcol™ 52	20	31	0	1	5	0	6	2	1,5	504
	100	37	0	0,6	6	0	9,5	3	2	626
	500	24,5	0,1	0,6	2	0	3	10	4,5	1 214
Creasil® IH CG	50	39	0,3	0,3	2	0	3	9	7	1 246
	250	37	0,1	0	5	0	8	5	3	828

	1250	47	0	0,6	6	0	11	4	2	722
	4	47	0,3	0	8	0	11	4	3	742
Huile B	20	23,5	0	0,04	8	0	3	3,5	3	925
	100	45,5	0,1	1,5	8,5	0	11	4,5	2	629

[0150] Le Tableau 8 détaille les effets des adjuvants sur les taux cytokiniques dans les surnageants de culture des cellules dendritiques cocultivées avec les lymphocytes autologues et après présentation antigénique (PPD).

[0151] [Tableau 8]

	% ou Dilution	**IL-2**	**IL-4**	**IL-5**	**IL-10**	**IL-12**	**IL-13**	**GM-CSF**	**IFN-γ**	**TNF-α**
NT		40	0	0,5	7	0	10	4	2	322
PPD		771	7	31	47	3	770	205	779	12 854
Hydroxyde d'aluminium	10	686	9	38	69	3	1 016	263	961	14 338
	4	1 189	14	43	86	5	617	465	1 689	22 704
Huile A	20	617	7	21	46	3	96	237	218	14 527
	100	913	9	21	56	3	257	260	438	15 487
	20	855	8	29	52	4	737	226	854	14 731
Marcol™ 52	100	770	9	35	67	3	917	241	851	15 248
	500	778	9	33	75	4	875	240	974	14 630
	50	1 003	10	33	78	4	657	304	1 032	17 861
Creasil® IH CG	250	1 031	10	47	72	4	1 809	429	1 026	17 150
	1250	951	9	33	63	4	769	265	893	17 289
	4	987	12	50	106	5	1 467	361	2 019	22 056
Huile B	20	843	9	28	57	4	526	266	1 490	16 369
	100	860	8	34	53	3	795	248	1 134	15 296

[0152] Les dosages de cytokines dans les surnageants de culture indiquent que les Huiles A et B, et en particulier l'Huile A, orientent la réponse vers un profil Th1 avec une augmentation des niveaux de TNF-α, d'IFN-γ et d'IL-2. Comme pour les macrophages, une augmentation du taux de GM-CSF est observée. Les Huiles A et B se distinguent des autres adjuvants testés au niveau des cytokines. En effet, les trois autres adjuvants engendrent peu ou pas de modulations des cytokines testées.

[0153] Les Huiles A et B favorisent la prolifération/activation des lymphocytes mis au contact des cellules présentatrice d'antigènes, que ce soient des macrophages ou des cellules dendritiques, en présence ou non d'un antigène comme la PPD.

[0154] Expression membranaire

[0155] Macrophages

[0156] [Tableau 9]

	Hydroxyde d'aluminium	Huile A	MarcolTM 52	Creasil® IH CG	Huile B
CD80	=	-	-	-	=
CD86	=	=	=	=	-
CD163	-	---	=	---	=
CD16	-	-	=	-	-
CD32	--	--	=	--	--
CD64	=	+	=	+	--
CD14	--	-	=	--	-
HLA-DR	=	-	=	-	=

Effets des adjuvants sur la différenciation des macrophages (Immunophénotypage et analyse 3 jours après le traitement).

[0157] L'effet des Huiles A et B sur l'expression membranaire des macrophages est proche de celui du Creasil® IH CG avec une forte diminution des protéines CD163 et de CD32 (*Cluster Differentiation*), un des récepteurs Fc (Fragment cristallisable) des immunoglobulines. Cette double modulation semble témoigner d'une orientation des macrophages vers un profil pro-inflammatoire de type M1, favorable à une réponse inflammatoire bénéfique de l'hôte contre une infection microbienne. Cette orientation est cohérente avec les productions cytokiniques, comme celle du TNF-α, décrit pour activer les macrophages orientés M1 et, celle de l'IL-12, secrétée par les mêmes macrophages M1. On notera parallèlement que les effets de l'hydroxyde d'aluminium (diminution de l'expression des CD14 et augmentation de l'expression des CD86) sont identiques à ceux préalablement décrits par le laboratoire (*Rimaniol & al., In vitro interactions*

between macrophages and aluminum-containing adjuvants. Vaccine, 2007, 25, 6784–6792). Ces résultats permettent d'asseoir les modulations observées avec les Huiles A et B.

[0158] Cellule dendritiques

[0159] [Tableau 10]

	Hydroxyde d'aluminium	Huile A	MarcolTM 52	Creasil® IH CG	Huile B
CD1a	**---**	**=**	**=**	**=**	**=**
HLA-DR	**=**	**=**	**-**	**--**	**+**
CD83	**++**	**++**	**=**	**-**	**+**
CD40	**=**	**=**	**=**	**=**	**=**

Effets des adjuvants sur la différenciation des cellules dendritiques. (Immunophénotypage et analyse 3 jours après le traitement).

[0160] S'agissant des marqueurs membranaires des cellules dendritiques, les Huiles A et B présentent un profil spécifique. D'une part, ils ne modulent pas l'expression de CD1a, spécifique des cellules dendritiques Et d'autre part, les Huiles A et B, et en particulier l'Huile A, augmente l'expression de CD83, un marqueur de la maturation des cellules dendritiques.

[0161] En conclusion, les Huiles A et B présentent un profil spécifique, orienté vers les réponses de type Th1 pour les lymphocytes et M1 pour les macrophages. Ils conduisent également à une maturation des cellules dendritiques. Ces profils, tout comme la synthèse macrophagique accrue de GM-CSF, sont supposés favoriser une réponse anti-infectieuse, rôle attendu d'un adjuvant.

[0162] <u>Exemple 3 : préparation d'une émulsion comprenant la composition adjuvante de l'invention – évaluation de la stabilité de l'émulsion</u>

[0163] Un exemple d'émulsion comprenant la composition adjuvante selon l'invention est donné dans le Tableau 11 ci-dessous. Les pourcentages sont des pourcentages en poids par rapport au poids total de la composition adjuvante.

[0164] [Tableau 11]

		Composition 1	Composition 2
Phase grasse	Huile	63,37 % d'Huile A	63,37 % de Marcol™ 52
	Tensioactif : SPAN® 80	4,00 %	4,00 %
Phase aqueuse	Eau déminéralisée	31,30 %	31,30 %
	Tensioactif : TWEEN® 80	1,33 %	1,33 %

[0165] Le mode opératoire de préparation de l'émulsion est le suivant :

[0166] L'huile et le tensioactif de la phase grasse sont introduits dans un tube à essai dans les proportions indiquées dans le Tableau 11. Le tube à essai est mis sous agitation et chauffé à 80°C jusqu'à l'obtention d'une phase homogène.

[0167] L'eau et le tensioactif de la phase aqueuse sont introduits dans un second tube à essai dans les proportions indiquées dans le Tableau 11. Le tube à essai est mis sous agitation et chauffé à 80°C jusqu'à l'obtention d'une phase homogène.

[0168] A 80°C, la phase aqueuse est versée lentement dans la phase grasse sous vive agitation. Puis l'émulsion est mélangée au moyen d'un mélangeur de type Turrax® à 9 500 tours/minute pendant 30 secondes.

[0169] Le mélange est laissé à refroidir jusqu'à 25°C sous agitation modérée.

[0170] Lorsque l'émulsion est réalisée, on observe une seule phase homogène. L'émulsion est alors centrifugée à T0 puis à après 24 heures pendant 20 minutes à 3 500 tours/minute avec une centrifugeuse Fisher Bioblock Scientific Sigma 1-6.

[0171] La stabilité de la composition décrite dans le Tableau 11 est observée visuellement après centrifugation à T0, après centrifugation après 24 heures (T24h) et après 90 jours (T2160h).

[0172] Le tube à essai comprend 6,6 cm d'émulsion, dont 4,2 cm de phase grasse. Une mesure manuelle du déphasage est faite, c'est-à-dire une mesure de la phase grasse relarguée au-dessus de l'émulsion.

[0173] [Tableau 12]

	T0	**T24h**	**T2160h**
Composition 1	0,1 cm	0,3 cm	4,2 cm
Composition 2	0,1 cm	0,4 cm	4,2 cm

Mesure du relargage de la phase grasse

[0174] A T0, on observe le même relargage pour l'émulsion comprenant l'huile Marcol™ 52 que pour l'émulsion comprenant l'Huile A.

[0175] Après 24 heures, l'émulsion comprenant l'huile Marcol™ 52 a davantage relargué que l'émulsion comprenant l'Huile A. On observe pour la composition comprenant l'Huile A, un relargage de 7,1% (= 0,3 / 4,2) de phase grasse par rapport à la quantité de phase grasse totale comprise dans l'émulsion, contre 9,5% (= 0,4 / 4,2) pour la composition comprenant l'huile Marcol™ 52.

[0176] Exemple 4 : préparation d'un vaccin comprenant la composition adjuvante de l'invention

[0177] Un exemple de vaccin comprenant la composition adjuvante selon l'invention est donné dans le Tableau 13 ci-dessous.

[0178] [Tableau 13]

		Composition 1	Composition 2
Phase grasse : composition adjuvante	Huile	132 g d'Huile A	132 g d'Huile B
	Tensioactif : SPAN® 80	8 g	8 g
Phase aqueuse contenant l'antigène	Eau + antigène (Newcastle)	57,5 g	57,5 g
	Tensioactif : TWEEN® 80	2,5 g	2,5 g

[0179] Le vaccin est préparé selon le protocole suivant :

[0180] - Préparation de la phase grasse :

[0181] Mélanger 132 g d'huile hydrocarbonée avec 8 g de Span® 80 au moyen d'un mélangeur de type Turrax® réglé à 10 000 tours/minute pendant 3 minutes à 25°C.

[0182] - Préparation de la phase aqueuse :

[0183] Mélanger 2,5 g de Tween® 80 avec 57,5 g d'une solution d'antigène au moyen d'un mélangeur de type Turrax® réglé à 10 000 tours/minute pendant 3 minutes à 25°C.

[0184] - Préparation de l'émulsion :

[0185] Introduire la phase grasse dans le mélangeur de type Turrax®, agiter 30 secondes à 10 000 tours/minute, puis ajouter doucement pendant 3 minutes la phase aqueuse en agitant à 10 000 - 12 000 tours/minute.

[0186] On obtient ainsi 200 g de vaccin sous forme d'émulsion eau-dans-l'huile.

Revendications

[Revendication 1] Composition adjuvante pour vaccin comprenant, par rapport au poids total de la composition adjuvante :

- au moins 40% en poids d'huile hydrocarbonée comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 90 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone ou 18 atomes de carbone et
- de 1 à 15% en poids de tensioactif(s).

[Revendication 2] Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites isoparaffines comprennent, par rapport au poids total des isoparaffines, au moins 2% en poids d'isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et/ou d'isoparaffines ayant 18 atomes de carbone.

[Revendication 3] Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'huile hydrocarbonée comprend :

- des isoparaffines ayant 15 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 16 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 80 à 95% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée; ou
- des isoparaffines ayant 15 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 16 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 40 à 80% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée ; ou
- des isoparaffines ayant 16 atomes de carbone, des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 18 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 80 à 98% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée ; ou
- des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone et des isoparaffines ayant 18 atomes de carbone en une quantité combinée allant de 80 à 98% en poids, par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée.

[Revendication 4] Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le tensioactif est choisi parmi les tensioactifs non-ioniques, de préférence les esters de sorbitane.

[Revendication 5] Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le tensioactif est un ester d'acide gras de sorbitane, de préférence un monooléate de sorbitane.

[Revendication 6] Composition selon l'une des revendications 1 à 5, comprenant, par rapport au poids total de la composition :

- de 60 à 98% en poids d'huile hydrocarbonée comprenant une teneur en poids d'isoparaffines allant de 95 à 100% par rapport au poids total de l'huile hydrocarbonée, lesdites isoparaffines incluant des isoparaffines ayant 17 atomes de carbone ou 18 atomes de carbone, et
- de 2 à 10% en poids de tensioactif(s).

[Revendication 7] Composition selon l'une des revendications 1 à 6, comprenant en outre une huile différente de ladite huile hydrocarbonée définie dans l'une des revendications 1 à 6, de préférence choisie parmi les n-paraffines comprenant de préférence de 14 à 30 atomes de carbone.

[Revendication 8] Composition selon la revendication 7, présentant un ratio massique huile hydrocarbonée/n-paraffines allant de 60/40 à 99/1, de préférence de 70/30 à 98/2, de préférence encore de 80/20 à 95/5.

[Revendication 9] Vaccin comprenant la composition adjuvante telle que définie dans l'une des revendications 1 à 8 et au moins un antigène.

[Revendication 10] Vaccin selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est sous forme d'une émulsion eau-dans-l'huile.

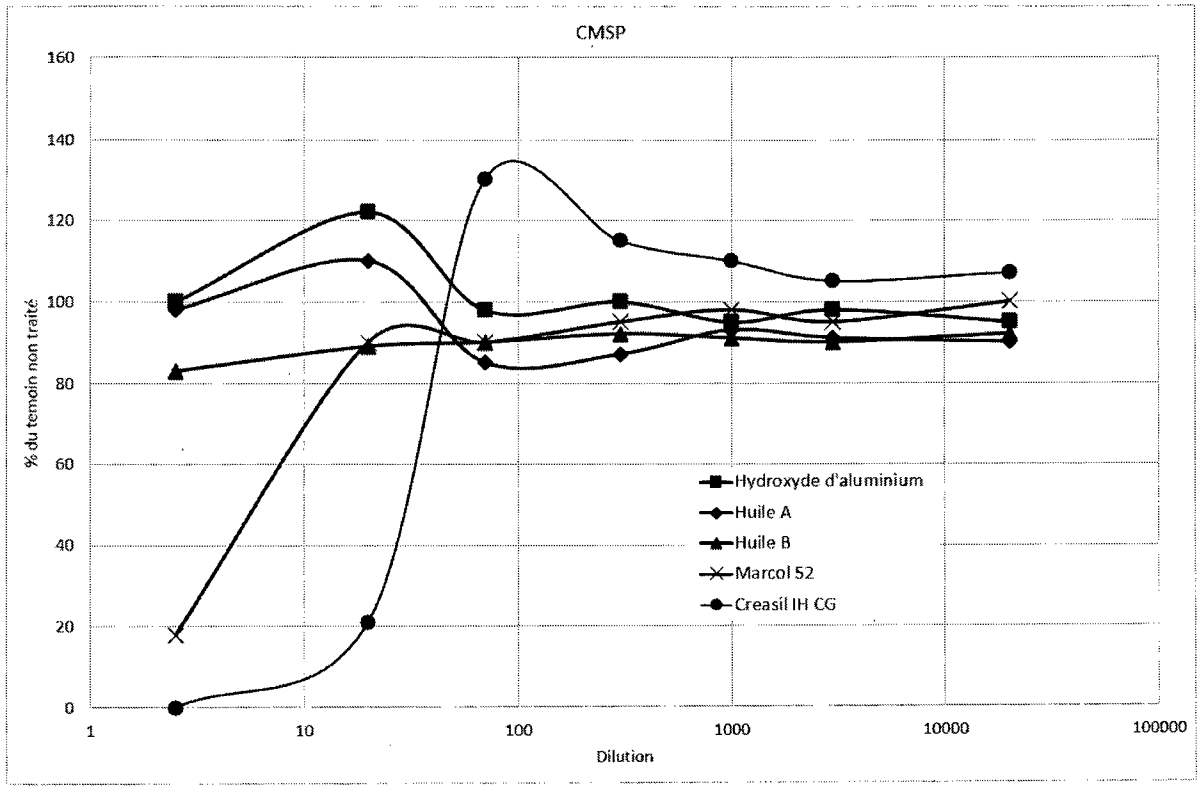
[Revendication 11] Vaccin selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ratio massique entre la phase aqueuse et la phase grasse de l'émulsion eau-dans-l'huile va de 50/50 à 10/90, de préférence de 40/60 à 20/80 et plus préférentiellement est de 30/70.

[Revendication 12] Utilisation d'une composition adjuvante selon l'une des revendications 1 à 8, pour diminuer la cytotoxicité d'un vaccin comprenant ladite composition adjuvante.

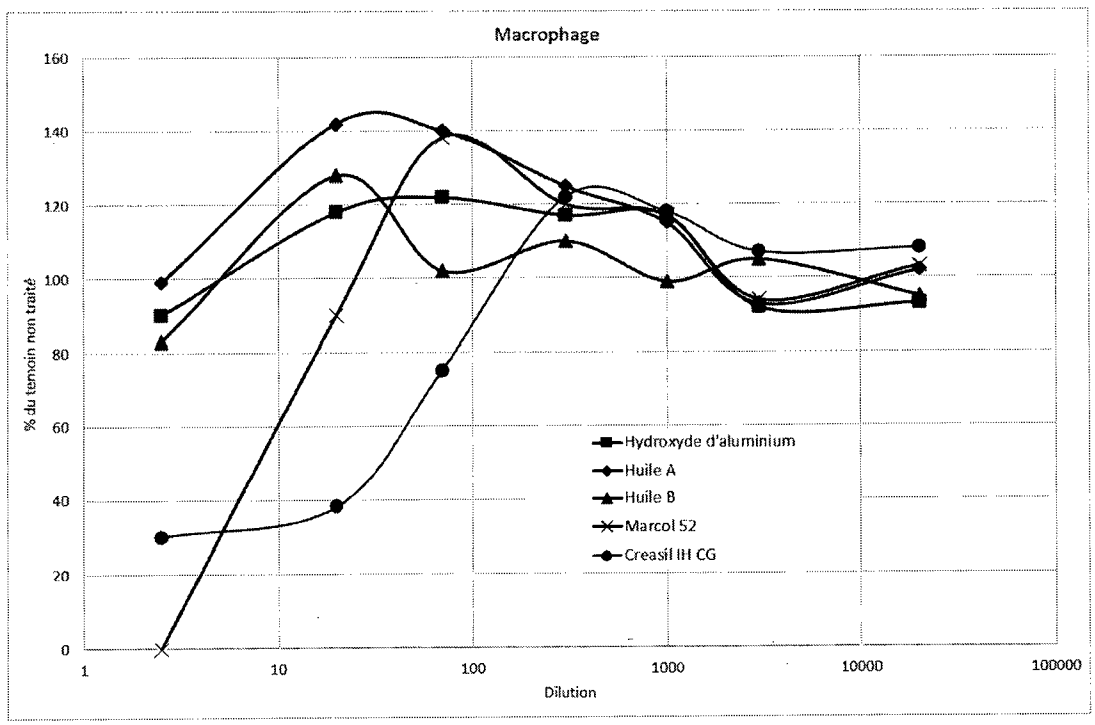
[Revendication 13] Utilisation de l'huile hydrocarbonée définie dans l'une des revendications 1 à 8, dans une composition adjuvante pour vaccin, pour diminuer la cytotoxicité du vaccin comprenant ladite composition adjuvante.

[Revendication 14] Utilisation de l'huile hydrocarbonée définie dans l'une des revendications 1 à 8, dans une composition adjuvante pour vaccin, pour améliorer la stabilité du vaccin, en particulier pour un vaccin sous la forme d'une émulsion

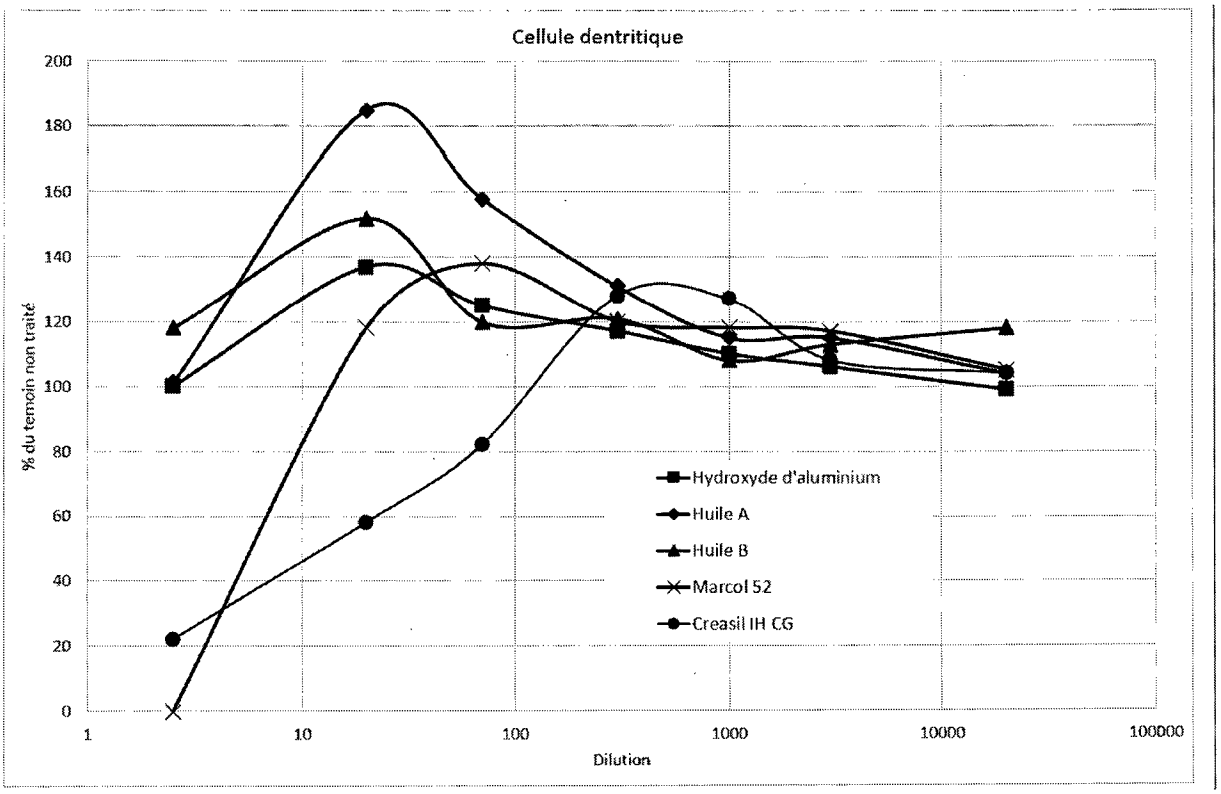
[Fig. 1]


CMSP
% du temoin non traité
Dilution
Hydroxyde d'aluminium
Huile A
Huile B
Marcol 52
Creasil IH CG

[Fig. 2]


Macrophage
% du temoin non traité
Dilution
Hydroxyde d'aluminium
Huile A
Huile B
Marcol 52
Creasil IH CG

[Fig. 3]


Cellule dentritique
% du témoin non traité
Dilution
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
10000
100000
Hydroxyde d'aluminium
Huile A
Huile B
Marcol 52
Creasil IH CG

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR2020/050267

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/39(2006.01)i

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, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3143981 A1 (TOTAL MARKETING SERVICES [FR]) 22 March 2017 (2017-03-22) page 2, paragraph 0013 - page 3, paragraph 0016 page 3, paragraph 0025 page 5, paragraph 0053 - page 8, paragraph 0089 page 8, paragraph 0098 - page 9, line 0108 page 10; table 1	1-8,14
X	EP 3095839 A1 (TOTAL MARKETING SERVICES [FR]) 23 November 2016 (2016-11-23) column 2, paragraph 0011 - paragraph 0013 column 3, paragraph 0026 column 7, paragraph 0054 - paragraph 0058	1-6
X	RU 2072868 C1 (SHABALINA TATYANA NIKOLAEVNA [SU]; FILIPPOVA GALINA IVANOVNA [SU]) 10 February 1997 (1997-02-10) page 3, left-hand column, line 1 - line 5 page 3, left-hand column, line 11 - right-hand column, line 18 page 3, right-hand column, line 34 - line 46 page 3, right-hand column, line 47 - page 4, left-hand column, line 14; claims; tables 1, 2	9-13

☑ 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	Date of mailing of the international search report
30 April 2020	**13 May 2020**
Name and mailing address of the ISA/EP **European Patent Office** **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands** Telephone No. **(+31-70)340-2040** Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	Authorized officer **Montero Lopez, B** Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2922767 A1 (SEPPIC SA [FR]) 01 May 2009 (2009-05-01) cited in the application page 10, line 11 - page 11, line 2 page 12, line 3 - line 9 page 13, line 24 - page 15, line 2 page 18, line 17 - line 20; examples 1-3 page 6, line 20 - page 7, line 18 page 5, line 1 - line 23	1-12
A	US 2006233831 A1 (PARISOT ALEXIS G A [FR] ET AL) 19 October 2006 (2006-10-19) page 1, paragraph 0008 - paragraph 0012 page 2, paragraph 0014 - paragraph 0023 page 5, paragraph 0072 - paragraph 0077 page 5, paragraph 0083; examples 1, 2	1-14
A	EP 0343548 A2 (BEHRINGWERKE AG [DE]) 29 November 1989 (1989-11-29) the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FR2020/050267

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
EP 3143981 A1	22 March 2017	CA 2998445 A1	23 March 2017
		CN 108348418 A	31 July 2018
		EP 3143981 A1	22 March 2017
		EP 3349720 A1	25 July 2018
		JP 2018527368 A	20 September 2018
		KR 20180052654 A	18 May 2018
		US 2019060192 A1	28 February 2019
		WO 2017046177 A1	23 March 2017
EP 3095839 A1	23 November 2016	AU 2016265463 A1	21 December 2017
		BR 112017024493 A2	24 July 2018
		CA 2985888 A1	24 November 2016
		CN 107667161 A	06 February 2018
		EP 3095839 A1	23 November 2016
		EP 3298108 A1	28 March 2018
		JP 2018519373 A	19 July 2018
		KR 20180011126 A	31 January 2018
		RU 2017141788 A	20 June 2019
		US 2018155636 A1	07 June 2018
		WO 2016185047 A1	24 November 2016
RU 2072868 C1	10 February 1997	NONE	
FR 2922767 A1	01 May 2009	AR 069010 A1	23 December 2009
		BR PI0818718 A2	22 April 2015
		CN 101808619 A	18 August 2010
		EP 2211834 A2	04 August 2010
		FR 2922767 A1	01 May 2009
		JP 5710260 B2	30 April 2015
		JP 2011500772 A	06 January 2011
		RU 2010119456 A	27 November 2011
		US 2010233196 A1	16 September 2010
		WO 2009053601 A2	30 April 2009
US 2006233831 A1	19 October 2006	AR 053360 A1	02 May 2007
		AU 2006236711 A1	26 October 2006
		AU 2010206041 A1	19 August 2010
		BR PI0610633 A2	13 July 2010
		CA 2604432 A1	26 October 2006
		CN 101184501 A	21 May 2008
		CY 1113104 T1	13 April 2016
		DK 1888107 T3	23 July 2012
		EP 1888107 A2	20 February 2008
		EP 2422809 A1	29 February 2012
		ES 2389377 T3	25 October 2012
		HK 1116085 A1	19 October 2012
		IL 186600 A	28 May 2014
		JP 5093902 B2	12 December 2012
		JP 2008536860 A	11 September 2008
		KR 20070122550 A	31 December 2007
		MY 144189 A	15 August 2011
		NZ 562663 A	30 April 2010
		NZ 584420 A	25 November 2011
		PL 1888107 T3	30 November 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FR2020/050267

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		PT	1888107	E	26 July 2012
		SI	1888107	T1	28 September 2012
		TW	I376232	B	11 November 2012
		UA	94404	C2	10 May 2011
		US	2006233831	A1	19 October 2006
		WO	2006113373	A2	26 October 2006
		ZA	200708634	B	29 October 2008
EP 0343548 A2	29 November 1989	AT	98494	T	15 January 1994
		DE	3817531	A1	07 December 1989
		EP	0343548	A2	29 November 1989
		ES	2061786	T3	16 December 1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2020/050267

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, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 3 143 981 A1 (TOTAL MARKETING SERVICES [FR]) 22 mars 2017 (2017-03-22) page 2, alinéa 0013 - page 3, alinéa 0016 page 3, alinéa 0025 page 5, alinéa 0053 - page 8, alinéa 0089 page 8, alinéa 0098 - page 9, ligne 0108 page 10; tableau 1 -----	1-8,14
X	EP 3 095 839 A1 (TOTAL MARKETING SERVICES [FR]) 23 novembre 2016 (2016-11-23) colonne 2, alinéa 0011 - alinéa 0013 colonne 3, alinéa 0026 colonne 7, alinéa 0054 - alinéa 0058 ----- -/--	1-6

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

[X] 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	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
30 avril 2020	13/05/2020

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Montero Lopez, B

2

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	RU 2 072 868 C1 (SHABALINA TATYANA NIKOLAEVNA [SU]; FILIPPOVA GALINA IVANOVNA [SU]) 10 février 1997 (1997-02-10) page 3, colonne de gauche, ligne 1 - ligne 5 page 3, colonne de gauche, ligne 11 - colonne de droite, ligne 18 page 3, colonne de droite, ligne 34 - ligne 46 page 3, colonne de droite, ligne 47 - page 4, colonne de gauche, ligne 14; revendications; tableaux 1, 2	9-13
A	FR 2 922 767 A1 (SEPPIC SA [FR]) 1 mai 2009 (2009-05-01) cité dans la demande page 10, ligne 11 - page 11, ligne 2 page 12, ligne 3 - ligne 9 page 13, ligne 24 - page 15, ligne 2 page 18, ligne 17 - ligne 20; exemples 1-3 page 6, ligne 20 - page 7, ligne 18 page 5, ligne 1 - ligne 23	1-12
A	US 2006/233831 A1 (PARISOT ALEXIS G A [FR] ET AL) 19 octobre 2006 (2006-10-19) page 1, alinéa 0008 - alinéa 0012 page 2, alinéa 0014 - alinéa 0023 page 5, alinéa 0072 - alinéa 0077 page 5, alinéa 0083; exemples 1, 2	1-14
A	EP 0 343 548 A2 (BEHRINGWERKE AG [DE]) 29 novembre 1989 (1989-11-29) le document en entier	1-14

2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2020/050267

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 3143981 A1	22-03-2017	CA 2998445 A1	23-03-2017
		CN 108348418 A	31-07-2018
		EP 3143981 A1	22-03-2017
		EP 3349720 A1	25-07-2018
		JP 2018527368 A	20-09-2018
		KR 20180052654 A	18-05-2018
		US 2019060192 A1	28-02-2019
		WO 2017046177 A1	23-03-2017
EP 3095839 A1	23-11-2016	AU 2016265463 A1	21-12-2017
		BR 112017024493 A2	24-07-2018
		CA 2985888 A1	24-11-2016
		CN 107667161 A	06-02-2018
		EP 3095839 A1	23-11-2016
		EP 3298108 A1	28-03-2018
		JP 2018519373 A	19-07-2018
		KR 20180011126 A	31-01-2018
		RU 2017141788 A	20-06-2019
		US 2018155636 A1	07-06-2018
		WO 2016185047 A1	24-11-2016
RU 2072868 C1	10-02-1997	AUCUN	
FR 2922767 A1	01-05-2009	AR 069010 A1	23-12-2009
		BR PI0818718 A2	22-04-2015
		CN 101808619 A	18-08-2010
		EP 2211834 A2	04-08-2010
		FR 2922767 A1	01-05-2009
		JP 5710260 B2	30-04-2015
		JP 2011500772 A	06-01-2011
		RU 2010119456 A	27-11-2011
		US 2010233196 A1	16-09-2010
		WO 2009053601 A2	30-04-2009
US 2006233831 A1	19-10-2006	AR 053360 A1	02-05-2007
		AU 2006236711 A1	26-10-2006
		AU 2010206041 A1	19-08-2010
		BR PI0610633 A2	13-07-2010
		CA 2604432 A1	26-10-2006
		CN 101184501 A	21-05-2008
		CY 1113104 T1	13-04-2016
		DK 1888107 T3	23-07-2012
		EP 1888107 A2	20-02-2008
		EP 2422809 A1	29-02-2012
		ES 2389377 T3	25-10-2012
		HK 1116085 A1	19-10-2012
		IL 186600 A	28-05-2014
		JP 5093902 B2	12-12-2012
		JP 2008536860 A	11-09-2008
		KR 20070122550 A	31-12-2007
		MY 144189 A	15-08-2011
		NZ 562663 A	30-04-2010
		NZ 584420 A	25-11-2011
		PL 1888107 T3	30-11-2012
		PT 1888107 E	26-07-2012
		SI 1888107 T1	28-09-2012
		TW I376232 B	11-11-2012
		UA 94404 C2	10-05-2011

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2020/050267

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		US 2006233831 A1	19-10-2006
		WO 2006113373 A2	26-10-2006
		ZA 200708634 B	29-10-2008
EP 0343548 A2	29-11-1989	AT 98494 T	15-01-1994
		DE 3817531 A1	07-12-1989
		EP 0343548 A2	29-11-1989
		ES 2061786 T3	16-12-1994