

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 977 800**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **11 56398**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 47/04 (2013.01), A 61 K 9/51, B 82 Y 5/00**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13.07.11.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 18.01.13 Bulletin 13/03.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SANOFI PASTEUR Société anonyme
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : MATHIEU YANNICK, LEBEAU
BENEDICTE, VALTECH VALENTIN, PATARIN JOEL,
GARINOT MARIE, HAENSLER JEAN et SAUZEAT
ELISABETH.

⑦3 Titulaire(s) : SANOFI PASTEUR Société anonyme.

⑦4 Mandataire(s) : SANOFI PASTEUR Société anonyme.

⑤4 COMPOSITION VACCINALE AVEC DES NANOPARTICULES D'HYDROXYDE D'ALUMINIUM.

⑤7 La présente invention a pour objet une composition
vaccinale comprenant au moins un antigène et un adjuvant,
caractérisée en ce que l'adjuvant comprend des nanoparti-
cules d'hydroxyde d'aluminium et de polyacrylate; l'hy-
droxyde d'aluminium se présente sous forme de boehmite
ou pseudo-boehmite.

FR 2 977 800 - 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 d'hydroxyde aluminium et de 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
20 part, dans le 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
25 comprenant au moins un antigène et un adjuvant, caractérisée en ce que l'adjuvant comprend des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium, notamment de boehmite ou pseudo-boehmite et de polyacrylate.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium, notamment de boehmite ou pseudo-boehmite et de polyacrylate pour la
30 préparation d'une composition vaccinale comprenant au moins un antigène.

La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation d'une composition vaccinale comprenant au moins un antigène et un adjuvant, selon lequel :

- on prépare des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium, notamment de boehmite ou pseudo-boehmite et de polyacrylate,

- 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.

5

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 , notamment après administration par voie intradermique (ID) et permettant d'effectuer en fin de procédé de fabrication, une stérilisation par filtration.

10

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 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

15

particules ont une taille inférieure à 220 nm, et même inférieure à 200 nm. De telles particules forment des suspensions colloïdales qui sont transparentes. Avantagement, 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

20

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 taille des particules dans une suspension colloïdale pour des rayons allant de la dizaine de nanomètres à quelques micromètres. Les particules en suspension dans un liquide sont soumises au mouvement brownien (agitation thermique et chocs entre

25 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 monochromatique type laser puis d'enregistrer les fluctuations de l'intensité lumineuse diffusée par ces particules à l'aide d'un photomultiplicateur (dispositif permettant de compter le nombre de photons).

30

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 un mode préféré de l'invention, les nanoparticules sont des particules de boehmite ou pseudo-boehmite et de polyacrylate. On utilise du polyacrylate car les polymères utilisés doivent être biocompatibles, c'est-à-dire ne pas présenter de toxicité pour l'organisme auquel on les administre ; en particulier, ils ne doivent pas s'y accumuler. En outre, le polymère utilisé doit être stable aux températures mises en oeuvre 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 polyacrylate de sodium 2100 fourni par la Société Fluka.
- 10 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 « *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 jusqu'à une valeur
- 15 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 légèrement blanchâtre et homogène) est récupéré par ultracentrifugation, lavé puis séché. Dans le cas de synthèses selon la présente invention, et ainsi que cela a été
- 20 décrit par Mathieu, Y. et al 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
- 25 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'il était avantageux de respecter un rapport molaire polyacrylate de sodium sur Aluminium compris entre 0,24 et 0,57.
- 30 Avant d'ajouter la base, ou du moins avant d'avoir ajouté la totalité de 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. Des essais d'augmentation de la température ou de la durée n'ont montré aucun avantage pour l'application envisagée. D'un point de vue industriel, il est donc très intéressant de pouvoir travailler à température ambiante, sur une durée courte qui peut
5 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 $Al(NO_3)_3$ ou encore de sulfate d'aluminium $Al_2(SO_4)_3$; de préférence, on choisit le chlorure d'aluminium $AlCl_3$.

10 Les bases utilisées pour augmenter le pH du mélange peuvent également 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 10,5-11. Durant cette phase d'augmentation de pH, les différentes espèces
15 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
20 est effectué sous agitation à une température comprise entre $90^\circ C$ et $200^\circ C$, plus particulièrement à $160^\circ C$.

Selon l'invention, les nanoparticules obtenues 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
25 effectués sur des filtres PTFE $0.22\mu m$ 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.

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, en
30 tampon TRIS, ou dans une solution saline comprenant 90g/l de NaCl, 0.12g/l de Na_2HPO_4 , et 0.6g/l de KH_2PO_4 .

Selon une caractéristique particulière de l'invention, la suspension comprenant les nanoparticules de boehmite ou pseudo-boehmite et de polyacrylate comprend également

un tensioactif, notamment un tensioactif neutre tel que le Brij-58[®], le Pluronic[®] 123 ou le Tween[®] 60, ou un tensioactif anionique tel que le SDS(dodecyl sulfâte de sodium), ou encore un polymère tel que le PEG (poly éthylène glycol). Ainsi, on peut augmenter la stabilisation des nanoparticules formées par effet stérique ou par répulsion

5 électrostatique.

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

10 antigènes recombinants de Shigella. 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
15 particle)...etc.

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,

20 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 pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae et meningitidis, Moraxella catarrhalis, Staphylococcus
25 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 leshmanioses ...etc.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut être une composition destinée à l'immunisation contre un seul pathogène ou cancer, c'est-à-dire qu'elle comprend un ou

30 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 l'agent de cette maladie (plusieurs souches ou sérotypes, ou clades, suivant la nature de l'agent).

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 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.

Selon l'invention, on prépare la composition vaccinale par simple mélange d'une suspension comprenant les nanoparticules de boehmite ou pseudo-boehmite et de polyacrylate et une suspension d'antigènes. Cette opération peut se faire par ajout des antigènes dans une suspension colloïdales 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 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 (100kd par exemple).

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

Exemple 1 : Synthèse de la suspension colloïdale de nanoparticules d'aluminium

On a utilisé du polyacrylate de sodium (NaPa) de masse moléculaire 2100 fourni par Fluka et du chlorure d'aluminium hexahydraté (AlCl_3) fourni par Avocado.

- On a dissous 9g de NaPa dans 75 ml d'une solution aqueuse de AlCl_3 0.1M. Le mélange
- 5 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 boehmite ou pseudo-boehmite. Pour obtenir les nanoparticules finales, la suspension obtenue à pH 10.5 a été
- 10 transférée dans un autoclave et chauffé 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 KD. La suspension colloïdale résultante a été stockée dans des
- 15 ampoules 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, 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.
- 20 L'échantillon a été analysé par diffraction de rayons X au moyen d'un diffractomètre STOE STADI-P utilisant la raie $\text{K}\alpha_1$ 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
- 25 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 faiblement cristallisé.
- 30 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 : Préparation d'une composition vaccinale comprenant des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium et de la protéine tétanique purifiée, et test de filtration.

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 boehmite préparée selon l'exemple 1.

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 conduit pas à l'aggrégation 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.

Exemple 3 : Test de réactogénicité sur souris d'une composition selon l'invention comprenant des nanoparticules et des antigènes de la grippe, administrée par voie intradermique.

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), 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 :

- 9 -

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

- 5 - 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
- 15 o 293 μl d'une suspension commerciale d' AlPO₄ à 4.15mg/ml d'aluminium (AdjuPhos®)
- Le mélange a été agité modérément pendant 2 heures.

- Groupe D : Flu ID + nanoAlOOH ; on a ajouté successivement :
 - 20 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 boehmite ou pseudo-boehmite, préparée de la manière décrite à l'exemple 1 et comprenant
 - 25 1.8mg d'Al/ml
- Le mélange a été agité modérément pendant 2 heures à température ambiante.

- Les souris ont été surveillées chaque jour, et on a noté sur une échelle non-officielle les oedèmes, les érythèmes et les lésions apparaissant à l'oreille, pendant 2 semaines
- 30 après chaque injection.
- Quelle que soit la formulation testée, aucun érythème significatif n'a été observé. De même, on n'a signalé aucun oedème.

- 10 -

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.

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 :

10 Tableau 1

Après la 1 ^{ère} injection (J0)											
Adjuvant	J1	J2	J3	J4	J7	J8	J9	J10	J11	J15	
AIOOH	0/10	0/10	0/10	0/10	6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	
AIPO 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
AIOOH	5/10	9/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	9/10
AIPO ₄	9/10	9/10	8/10	7/10	9/10	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.

Exemple 4 : 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 AIOOH ou AIPO₄, 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

- 11 -

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.

- 5 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.

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.

- Groupe B : Flu ID + AlPO₄ ; on a ajouté successivement :

15

- 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®)

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®)

25

Le mélange a été vortexé pendant 10 secondes.

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

30

- o 54µl de Flu ID stock,
- o 5 µl de H₂O
- o 76 µl de tampon PBS concentré 10 fois,

- 12 -

- 675 µl de suspension de nanoparticules de boehmite ou pseudo-boehmite, préparée de la manière décrite à l'exemple 1 et contenant 1.8mg d'Al/ml.

Le mélange a été vortexé pendant 10 secondes.

5

- 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,

- 10
- 675 µl de PaNa (polyacrylate de sodium) de masse moléculaire 2100 fourni par Fluka

Le mélange a été vortexé pendant 10 secondes.

On a surveillé les souris durant tout le test.

- 15 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.

- 20 Les tests qui ont été réalisés sont des dosages ELISA, des tests d'inhibition de l'hémagglutination, 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

- 25 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'hémagglutination permet d'apprécier les anticorps fonctionnels présents dans le sérum des animaux immunisés. Il mesure la capacité des anticorps

- 30 induits à inhiber l'hémagglutination de globules rouges de poulet par le virus grippal étudié. Le titre d'inhibition de l'hémagglutination ou HI (Haemagglutination Inhibition) est l'inverse de la dernière dilution pour laquelle on n'observe pas d'hémagglutination.

Pour chaque groupe d'animaux, on a calculé la moyenne géométrique ainsi que

- 13 -

l'intervalle de confiance à 95% correspondant. Ceci vis-à-vis de chacune des 3 souches présentes dans la composition administrée.

5 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.

10 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 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%
15 sont indiqués entre crochets :

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
 5 l'invention, il est possible d'obtenir une réponse cellulaire, notamment une stimulation
 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 ($p = 0.002$),
 10 respectivement, ce qui n'est pas le cas des adjuvants à base d'aluminium de l'art
 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
 15 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 Dunnett (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 10 6.3 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.

- 15 D'autre part, seules les nanoparticules selon l'invention conduisent à une augmentation de 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

- 5 1. Composition vaccinale comprenant au moins un antigène et un adjuvant, caractérisée en ce que l'adjuvant comprend des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium et de polyacrylate.
2. Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'hydroxyde d'aluminium est sous forme de boehmite ou pseudo-boehmite.
- 10 3. 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.
- 15 4. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène de la grippe.
5. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une protéine tétanique.
- 20 6. Utilisation de nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium et de polyacrylate pour la préparation d'une composition vaccinale comprenant au moins un antigène.
7. Utilisation selon la revendication précédente, caractérisée en ce que la composition vaccinale est destinée à être administrée par voie intradermique.
- 25 8. Utilisation selon une des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que la composition vaccinale comprend au moins un antigène de la grippe.
- 30 9. Utilisation selon une des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que lesdites nanoparticules permettent d'augmenter la réponse immunitaire induite lors de l'administration de ladite composition vaccinale.
- 35 10. Procédé de préparation d'une composition vaccinale selon une des revendications 1 à 5, selon lequel :
 - on prépare des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium et d'acrylate,
 - on filtre lesdites nanoparticules au moyen d'un filtre stérilisant,
 - on ajoute auxdites nanoparticules au moins un antigène vaccinal, et
 - de façon optionnelle, on filtre le mélange final.



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

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

FA 756176
FR 1156398

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	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 * -----	1-10	A61K47/04 A61K9/51 B82Y5/00
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 * -----	1-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
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 * ----- -/--	1-10	A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 avril 2012		Ferreira, Roger	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

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

FA 756176
FR 1156398

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
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] * -----	1-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
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 * -----	1-10	
A	US 2005/158334 A1 (CONTORNI MARIO [IT] ET AL) 21 juillet 2005 (2005-07-21) * le document en entier * -----	1-10	
A	EP 1 126 876 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE] GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]) 29 août 2001 (2001-08-29) * le document en entier * -----	1-10	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 avril 2012		Ferreira, Roger	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

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

FA 756176
FR 1156398

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A,D	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, XP55024971, ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/la700233q * le document en entier *	1-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	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, XP55024975, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.20692 * le document en entier *	1-10	
A	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 *	1-10	
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 avril 2012		Ferreira, Roger	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 756176
FR 1156398

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	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 * -----	1-10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		23 avril 2012	Ferreira, Roger
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1156398 FA 756176**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23-04-2012

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
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
		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 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		
		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

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1156398 FA 756176**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23-04-2012

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 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
		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
		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
		LU 91389 A9	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		

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1156398 FA 756176**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **23-04-2012**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		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
