

(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  
8 juin 2006 (08.06.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2006/059009 A1**

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

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2005/002995

(22) Date de dépôt international :  
1 décembre 2005 (01.12.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0452838 2 décembre 2004 (02.12.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : SA  
VETOQUINOL [FR/FR]; 34, rue du Chêne Saint Anne,  
Magny-Vernois, F-70200 LURE (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MOREAU,  
Marinette [FR/FR]; 2, Route Monts Reveaux, F-70200  
Saint Germain (FR). OSTY, Nicolas [FR/FR]; Appt.18, 12,  
rue Saint-Exupéry, F-70300 Luxeuil-les-Bains (FR).

(74) Mandataire : BREESE DERAMBURE-MAJEROW-  
ICZ; 38 avenue de l'Opéra, F-75002 PARIS (FR).

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

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL PHARMACEUTICAL COMPOSITION USEFUL FOR VACCINES

(54) Titre : NOUVELLE COMPOSITION PHARMACEUTIQUE UTILISABLE DANS LE DOMAINE DES VACCINS

(57) Abstract: The invention concerns the field of pharmaceutical compositions, in particular in the field of vaccines. More pre-  
cisely, the invention concerns a pharmaceutical composition useful as vaccine (or vaccine composition). The invention also concerns  
a method for preparing said inventive vaccine composition.

(57) Abrégé : La présente invention se place dans le domaine des compositions pharmaceutiques, particulièrement dans le domaine  
des vaccins. Plus précisément, l'invention a pour objet une nouvelle composition pharmaceutique utilisable comme vaccin (ou com-  
position vaccinale). L'invention a aussi pour objet un procédé de préparation de ladite composition vaccinale selon l'invention.



WO 2006/059009 A1

## NOUVELLE COMPOSITION PHARMACEUTIQUE UTILISABLE DANS LE DOMAINE DES VACCINS

La présente invention se place dans le domaine des  
5 compositions pharmaceutiques, particulièrement dans le  
domaine des vaccins. Plus précisément, l'invention a pour  
objet une nouvelle composition pharmaceutique utilisable  
comme vaccin (ou composition vaccinale).

L'invention a aussi pour objet un procédé de  
10 préparation de ladite composition vaccinale selon  
l'invention.

Dans le domaine des vaccins, il est bien connu que  
l'efficacité de la composition vaccinale est  
essentiellement due au mélange de l'antigène utilisé avec  
15 un adjuvant. Les adjuvants pour vaccins sont connus depuis  
fort longtemps et sont définis comme des compositions qui,  
lorsqu'elles sont combinées à un antigène, produisent une  
réponse immunitaire supérieure à celle de l'antigène seul.

Le pouvoir immunogène d'un vaccin sans adjuvant est en  
20 règle générale faible, en particulier s'il s'agit d'un  
vaccin inactivé ou si l'antigène est simplement un peptide  
ou une protéine, et ne permet en lui-même d'induire une  
réponse protectrice.

De nombreuses recherches sont conduites afin d'obtenir  
25 des adjuvants satisfaisants, lesquels, de manière idéale  
devraient présenter les propriétés suivantes:

- induire une réponse immunitaire importante,  
particulièrement avec une dose d'antigène minimale ;
- induire une réponse immunitaire mixte (humorale et  
30 cellulaire) afin de favoriser et d'établir une réponse  
mémoire ;
- être parfaitement toléré et dénué de toxicité ;
- être constitué si possible d'excipients couramment

utilisés dans le domaine pharmaceutique, plus particulièrement celui des médicaments injectables ;

- être facile à administrer, par exemple à l'aide d'une seringue et, si possible, à conditionner directement en seringue prête à l'emploi ;

- être facile à associer à des antigènes variés, de manière à permettre de standardiser la production de vaccins divers ;

- être de production aisée à l'échelle industrielle avec un procédé d'obtention facile à maîtriser ;

Il est connu dans l'art antérieur, une multitude d'adjuvants de nature et d'origine diverses.

L'alun (phosphate et hydroxyde d'aluminium) est un adjuvant dont l'utilisation est répandue dans les vaccins humains et vétérinaires.

D'autres adjuvants sont connus et utilisés pour la recherche tel l'adjuvant de Freund constitué d'un mélange d'huile minérale et de mycobactéries tuées. Cet adjuvant est extrêmement efficace et produit des réponses immunitaires marquées. Sa mauvaise tolérance limite toutefois son emploi à la recherche sur l'animal de laboratoire.

Divers brevets décrivent des compositions d'adjuvants pour vaccins.

Le brevet américain n° 4,788,056 décrit un vaccin combiné contre l'herpès et *E. coli* destiné à la vaccination du bétail. Ce brevet cite différents adjuvants possibles, parmi lesquels des émulsions d'huile dans l'eau ou d'eau dans l'huile à base de certaines huiles telles que le Miglyol® (triglycérides à chaîne moyenne) ou de tensioactifs tels que le polysorbate, sans toutefois indiquer de formulation précise de l'adjuvant. Il s'agit toutefois d'émulsions classiques, où la phase dispersée existe sous forme de gouttelettes. D'autre part, aucune

indication n'est donnée quant à l'effet de l'adjuvant sur le pouvoir immunogène du vaccin.

Le brevet américain n° 5,688,761 décrit une formulation de microémulsion eau dans huile qui se convertit en système  
5 huile dans eau par addition d'un fluide aqueux ce qui conduit à la libération de la protéine contenue dans la phase aqueuse. L'avantage des microémulsions est leur formation spontanée et leur stabilité physique. Les huiles utilisées par ces auteurs sont des huiles bien tolérées par  
10 voie injectable telles que les mono et triglycérides à chaîne moyenne. Elles sont émulsionnées à la phase aqueuse grâce à l'emploi de tensioactifs classiques et connus de l'homme du métier tels que les esters de sorbitane ou les polysorbates. Leur dilution par les fluides biologiques  
15 lors de leur injection provoque l'inversion des phases et donc la libération de l'agent biologique incorporé dans la phase aqueuse. Certains exemples de formulation démontrent une augmentation de l'activité d'agents biologiques incorporés dans la formulation décrite. Toutefois, les  
20 exemples fournis ne concernent pas le domaine des vaccins.

Le brevet américain n° 5,744,137 décrit l'utilisation d'huiles non minérales dans des vaccins ainsi que des vaccins sous forme d'émulsions eau dans huile contenant un  
25 mélange d'au moins deux tensioactifs choisis parmi l'huile de ricin éthoxylée, le laurate de propylène glycol, le caprylate de propylène glycol et le succinate d'isostéryle diglycéryle. Les huiles choisies sont d'origine animale ou végétale afin de limiter au maximum la réaction des tissus liée à l'administration d'huiles minérales mal tolérées.

30 Le brevet américain n° 5,961,970 décrit un adjuvant pour vaccin se présentant sous la forme d'une submicroémulsion huile dans eau comprenant un émulsifiant (il s'agit d'un phospholipide), un tensioactif non ionique et une huile. Le coût élevé des phospholipides limite

cependant les applications de cette invention.

La demande de brevet américain n° 2003011977, décrit une composition constituée de vésicules lipidiques biphasiques permettant d'améliorer la réponse immunitaire induite par un antigène.

La demande de brevet américain n° 20030175309 décrit un adjuvant contenant de la lécithine, une huile et un tensioactif amphiphile capable de former un vaccin sous forme d'une émulsion stable huile dans eau qui permet de minimiser les réactions locales chez l'animal injecté.

La demande Internationale WO 99/61003 décrit un système de délivrance d'actifs comprenant une réserve de médicament sous forme solide étroitement compactée, ayant une structure isotrope à l'état solide. Ce système est adéquat pour délivrer des actifs par inhalation. L'actif se présente sous la forme de liposomes, les liposomes étant ensuite compactés afin de former le système de délivrance solide décrit.

La demande de brevet européen n° 0 398 287, décrit une composition pharmaceutique sous forme d'une solution isotrope consistant en une ou plusieurs substances actives et un support se solidifiant entre 20°C et 80°C (particulièrement à température ambiante) et étant soluble dans l'eau.

Il n'en demeure pas moins qu'il existe un besoin toujours renouvelé dans l'industrie des vaccins pour des adjuvants nouveaux présentant les propriétés énoncées précédemment. Particulièrement, le besoin demeure de fournir des adjuvants permettant une forte augmentation du pouvoir immunogène de l'antigène. Un avantage de tels adjuvants réside dans le fait qu'ils permettent d'administrer des doses réduites d'antigène tout en conservant une réponse immunitaire satisfaisante.

Il est particulièrement souhaitable de disposer des telles compositions lorsque l'antigène est coûteux ou difficile à produire en quantité suffisante ou lorsqu'il s'agit de simple peptide ou d'antigènes obtenus par  
5 synthèse ou recombinaison.

De manière surprenante et inattendue, les inventeurs ont maintenant découvert qu'une composition pharmaceutique sous la forme d'un isotrope huileux, au moins composée d'un mélange ternaire huile /tensioactif(s)/phase aqueuse,  
10 ladite phase aqueuse comprenant la substance antigénique, pouvait présenter un pouvoir immunogène nettement plus élevé qu'une composition ternaire de l'art antérieur sous la forme d'une émulsion, sous une forme non isotrope. De plus, une composition sous une forme isotrope peut  
15 présenter une viscosité compatible avec une utilisation par injection.

Le terme "isotrope" sera utilisé ci-après pour désigner l'isotrope huileux selon l'invention, c'est-à-dire le mélange ternaire isotrope huile/tensioactif(s)/phase  
20 aqueuse selon l'invention. De même "isotrope comprenant une substance antigénique" désignera une composition selon l'invention dans laquelle la substance antigénique est incluse dans la phase aqueuse de l'isotrope huileux selon l'invention.

Par isotrope huileux, on entend un mélange d'huile, d'eau et de tensioactifs dont les proportions sont ajustées de telle sorte que la préparation obtenue soit limpide, claire et présente une faible viscosité. Ainsi une telle composition peut être administrée par injection. Une telle  
30 composition correspond à une solubilisation d'eau dans une huile, ou plus précisément d'eau dans un micelle, lui-même dans une huile (isotrope huileux).

En effet, lors de la constitution de l'isotrope, il se forme des agrégats moléculaires de tensioactifs appelés

micelles, au sein desquels l'actif est inséré plus ou moins profondément.

Les isotropes sont bien connus et l'on trouvera tous les renseignements nécessaires entre autres dans Galenica, 1983, Vol. 5, Chapitre 5, page 195-219. En particulier, cet ouvrage présente des diagrammes ternaires eau/huile/tensioactif, par exemple en page 203 un diagramme eau/huile de paraffine/Brij 96, permettant de déterminer les concentrations respectives de ces composés pour lesquels un système isotrope est obtenu.

Plus précisément, une composition sous forme isotrope présente une structure tridimensionnelle continue, également appelée structure monophasique.

Les émulsions pour leur part sont formées par un système de deux liquides non miscibles, dont l'un est finement divisé en gouttelettes, ou vésicules, dans l'autre. La phase dispersée est appelée phase interne ou discontinue, la phase dispersante est appelée phase externe ou continue. Une émulsion est donc une dispersion liquide-liquide, qui présente une structure biphasique.

Une composition sous forme isotrope se distingue d'une émulsion par l'absence d'organisation de type vésicules et la présence de micelles.

Par «organisation de type vésicule », on entend au sens de la présente invention, une structure présentant une paroi comprenant, ou constitué par, des composants de type tensioactifs, ladite paroi englobant un volume comprenant, ou constitué par, une phase interne hydrophile lorsque la phase externe est hydrophobe et vice-versa.

Les résultats, présentés ci-après et obtenus sur des animaux de laboratoire lors d'essais avec un isotrope

comprenant une substance antigénique selon l'invention, ont démontré qu'il était possible d'obtenir avec un tel isotrope, une augmentation très significative de l'activité immunogène de l'antigène comparée à l'activité immunogène  
5 obtenue avec l'antigène en combinaison avec un adjuvant classique.

De plus, ces essais ont montré que l'isotrope surclassait les préparations constituées d'émulsions eau dans huile classiques.

10 L'invention découle donc de cette découverte.

L'invention a donc pour premier objet une composition pharmaceutique comprenant au moins un mélange d'au moins une huile, d'au moins un tensioactif et d'une phase aqueuse comprenant elle-même au moins une substance active, ladite  
15 composition pharmaceutique étant sous la forme d'isotrope huileux. Cette composition est sous forme isotrope, elle n'est donc pas sous forme d'émulsion.

En particulier, la composition présente une viscosité compatible avec une utilisation par injection.

20 Selon l'invention, la substance active peut être tout type d'actif biologique comme par exemple un antigène vivant, atténué ou inactivé. On entend par antigène vivant : une bactérie ou un virus atténué empiriquement ou génétiquement, un antigène protéique (ou glyco-  
25 lipoprotéique) exprimé *in vivo* par un vecteur (bactérie ou virus recombinant). On entend par antigène inactivé une bactérie ou un virus inactivé soit par des méthodes physiques soit par des méthodes chimiques ou un extrait bactérien ou viral, ou une protéine, un polypeptide ou un  
30 peptide obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique, ou au moins un générateur *in vivo* d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés.

Tout particulièrement l'actif biologique peut être

inerte.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition pharmaceutique est un vaccin. Sous cette forme, la substance active est alors un  
5 antigène. Ledit antigène peut être de toute origine et sous toute forme communément utilisée dans le domaine de la vaccination. L'antigène peut être par exemple, d'origine virale, bactérienne, parasitaire ou encore tumorale.

L'antigène peut être naturel ou recombinant.

10 Il peut être composé d'un microorganisme (virus, bactéries ou parasites), éventuellement atténué ou inactivé, ou de fractions, particulièrement acellulaires, dudit microorganisme (antigènes purifiés, protéines ou glyco-protéines ou peptides natifs, polynucléotides, qu'ils  
15 soient de synthèse ou produits par génie génétique notamment), ou encore à base d'antigènes hydro-solubles ou hydro-dispersibles.

Préférentiellement, on utilisera selon l'invention une phase antigénique composée des molécules excrétées par  
20 ledit microorganisme que ce soient des composants de la paroi bactérienne ou des composants du cytoplasme.

La quantité de substance active et/ou d'antigène dans la composition selon l'invention est fonction de l'effet recherché et de la nature même de la substance active ou de  
25 l'antigène utilisé. L'Homme du Métier sait en fonction de la substance active ou de l'antigène utilisé doser celui-ci.

Les proportions de chacun de ces constituants de l'isotrope sont ajustées de manière à ce que l'ensemble  
30 forme un isotrope huileux.

Plus précisément, la concentration en tensioactif peut être supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). Pour une concentration inférieure à la CMC, l'essentiel du tensioactif est sous forme de monomère, en

revanche pour une concentration supérieure à la CMC, il y a une présence appréciable de micelles.

La valeur de la CMC peut être déterminée par diverses méthodes, par exemple la conductimétrie ou la spectrophotométrie, notamment comme décrit dans l'article de Dominguez et al., « Journal of Chemical Education », 1997, 1227-1231. En général, la CMC correspond un changement brusque de la loi de variation du paramètre mesuré, par exemple la conductance ou l'absorbance.

10 Ainsi, les compositions selon l'invention peuvent comprendre une teneur en tensioactif supérieure ou égale à la concentration micellaire critique. Cette concentration micellaire critique dépend de plusieurs paramètres, dont la nature des composants présents dans la composition et leur  
15 teneur.

Ainsi, la composition selon l'invention comprendra au moins une forte concentration en tensioactif et une faible quantité d'eau.

Selon l'invention, la composition peut comprendre de  
20 10% à 90% d'une huile, préférentiellement de 40% à 75% en poids, par rapport au poids de la composition totale.

Selon l'invention encore, la quantité d'eau dans la composition sera comprise entre 0,5% et 20%, préférentiellement entre 3% et 9 % en poids, par rapport au  
25 poids de la composition totale

Selon l'invention enfin, la quantité de tensioactif dans la composition peut être comprise entre 1% à 60%, préférentiellement entre 16% et 45% en poids, par rapport au poids de la composition totale.

30 Selon l'invention, le rapport de la quantité d'huile à la quantité d'eau ne doit pas être inférieur à 1 (quantité d'huile égale à la quantité d'eau), préférentiellement ne doit pas être inférieur à 5 (quantité d'huile au moins 5 fois plus grande que la quantité d'eau).

De nombreuses huiles peuvent être utilisées dans la composition selon l'invention. Cependant ladite huile doit être compatible avec un usage pharmaceutique, particulièrement pour un usage par injection par voie parentérale.

L'huile peut être choisie parmi :

- les huiles minérales, comme et sans limitation, l'huile de paraffine, l'huile de vaseline,
- les huiles non-minérales, comme l'huile de foie de morue, les lipides synthétiques, les huiles végétales, (telles que sans limitation l'huile de soja, l'huile d'olive, l'huile de maïs, l'huile d'arachide, l'huile de graines de coton, l'huile de tournesol, l'huile de sésame, l'huile de ricin, l'huile d'amande), des triglycérides à chaînes moyennes et longues (comme les triglycérides des acides caprylique/caprique comme ceux vendus par la société Stearinerie Dubois ou ceux vendus sous les dénominations Miglyol 810®, 812® et 818® par la société Dynamit Nobel), les huiles terpéniques telles que le squalane et le squalène, et
- leurs mélanges.

Selon l'invention, on préfère utiliser une huile telle que le squalène ou de préférence une huile de la famille des triglycérides et très préférentiellement des triglycérides à chaînes moyennes du type Mygliol 810.

Selon l'invention, on peut utiliser un mélange d'huile.

Les tensioactifs utilisables selon l'invention peuvent être anioniques, cationiques, non ioniques ou amphotères.

La classe préférée en raison de sa bonne tolérance, particulièrement lors d'une injection est celle des tensioactifs non ioniques. Préférentiellement parmi ceux-ci, tous ceux utilisables par voie injectable peuvent être utilisés seuls ou en mélange. On citera à titre d'exemple

et sans que cette liste ne puisse être considérée comme limitative, les polysorbates, les esters de sorbitane, particulièrement les esters de sorbitane et d'acide gras, les dérivés polyoxy-éthylénés de l'huile de ricin, les  
5 dérivés polyoxyéthylénés de l'acide stéarique, les copolymères d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène ou poloxamères, les esters de saccharose et d'acide gras, les esters de glycol et d'acides gras, les mono-, di- et tri-  
10 esters d'acide gras et de glycérol, les esters de polyéthylèneglycols et d'acides gras, les esters de saccharose et d'acides gras.

Préférentiellement selon l'invention, on utilise les polysorbates, les esters de sorbitane, particulièrement les esters de sorbitane et d'acide gras.

15 Selon l'invention, il est possible d'utiliser un mélange de deux ou de plusieurs tensioactifs. Ces tensioactifs pourront avoir des HLB identiques ou différents (balance hydrophile-lipophile qui est une caractéristique des tensioactifs, liée à la structure de  
20 leur molécule).

Préférentiellement, les tensioactifs auront des HLB différents de manière à s'approcher de la HLB critique de la phase huileuse utilisée. La HLB critique est fonction de la concentration des émulsionnants et de la nature chimique  
25 des tensioactifs.

L'Homme du Métier trouvera sans difficulté dans "Handbook of excipients", (Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Paul J. Weller- 4<sup>ème</sup> Edition, 2003) par exemple, les HLB des tensioactifs et pourra donc, en fonction de la composition  
30 du mélange qu'il désire réaliser, choisir le ou les tensioactifs adéquats.

Selon l'invention, la phase aqueuse peut contenir outre l'antigène hydrosoluble ou hydrodispersible et l'eau, d'autres substances comme des sels destinés à complexer

l'antigène de manière à retarder sa libération et donc à prolonger son action. Comme exemple de sels de ce type, on peut citer le silicate d'alumine ou le phosphate de calcium.

5        La phase aqueuse peut également contenir de manière optionnelle, des substances immunogènes non spécifiques connues de l'Homme du Métier telles que le lipopolysaccharide, ou le chitosan. De même, elle peut contenir des polymères, des copolymères non ioniques (comme par exemple  
10 le Poloxamère), de l'argile synthétique (comme par exemple la Laponite®, Chimilab Essor), des cytokines, ou des antioxydants tels la vitamine E, reconnus pour leur pouvoir immunostimulant.

      Selon l'invention, la composition présente une  
15 viscosité comprise entre 5 et 150 mPa.s de préférence entre 5 et 100 mPa.s.

      La viscosité de la composition est mesurée à température ambiante, préférentiellement à 25°C, en utilisant un viscosimètre du type rotor-stator, comme par  
20 exemple un appareil de la marque Rhéo dénommé HAAK-VT500, selon les prescriptions du fabricant.

      La composition selon l'invention peut être préparée selon tout mode opératoire connu de l'Homme du Métier. Par exemple une composition selon l'invention peut être  
25 préparée selon le mode opératoire suivant :

      - dans une première étape, l'antigène est dissous ou dispersé dans la phase aqueuse dans laquelle sont également éventuellement incorporées les substances additionnelles ci-dessus décrites et le mélange est chauffé, par exemple  
30 au bain-marie, à une température comprise entre 30 et 60°C, préférentiellement entre 35 et 45°C ;

      - dans une seconde étape, qui peut être concomitante, le ou les tensioactifs sont mélangés à l'huile et le mélange est chauffé, par exemple au bain-marie, à une température

comprise entre 30 et 60°C, préférentiellement entre 35 et 45°C ;

- dans une troisième étape, la phase aqueuse est incorporée à la phase huileuse en employant un homogénéiseur (tel que par exemple un homogénéiseur Rayneri® 33300). Ces appareils sont largement employés, particulièrement dans la préparation des émulsions, et l'Homme du Métier n'aura donc aucune difficulté pour réaliser le mélange selon l'invention ; et

10 - dans une dernière étape l'isotrope huileux obtenu est refroidi à température ambiante et stérilisé. Divers procédés décrits dans la littérature sont utilisables pour cette opération tels que par exemple la stérilisation par la chaleur, par rayonnements ionisants ou par filtration. Le mode de faire préféré est celui de la filtration stérilisante.

Selon un autre mode de réalisation, il est également possible d'employer des matières premières elles-mêmes stériles et d'opérer l'ensemble de la fabrication en salle blanche, de manière à ne pas être obligé de recourir à une opération finale de stérilisation.

Les exemples suivants sont donnés à titre d'illustration de l'invention et ne la limite aucunement. D'autres réalisations sont possibles selon un mode de réalisation identique.

#### **Exemple 1 : Composition de la phase antigénique**

Dans les trois exemples qui suivent, une même phase aqueuse contenant l'antigène est utilisée. Il s'agit d'une phase antigénique acellulaire composée d'antigènes excrétés lors de la culture d'une souche bactérienne de *Streptococcus suis*. Cette bactérie est responsable d'une pathologie sévère et très répandue chez le porcelet.

L'infection est caractérisée par des troubles nerveux (incoordination motrice, tremblements, convulsions) et articulaires. Des septicémies ont également été rapportées, ainsi que des lésions pulmonaires. Une transmission à  
5 l'Homme est possible (personnel des abattoirs, vétérinaires).

Seul le surnageant acellulaire de la culture est utilisé. Il s'agit d'un mélange de protéines dont l'une est utilisée comme marqueur d'activité : la protéine MRP  
10 (Muramidase Released Protein), dont le titre peut être déterminé par test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Un anticorps monoclonal anti-MRP est fixé dans les puits d'une plaque de micro-titration. Après une phase de saturation permettant d'éviter une adsorption non  
15 spécifique, le vaccin (contenant l'antigène à doser) est dilué et déposé dans chaque puits. Après lavage, un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine MRP et couplé à une enzyme est ajouté. La réaction avec le substrat/chromogène de l'enzyme permet d'obtenir une  
20 réaction colorée mesurée par un lecteur de plaques. L'intensité de coloration est directement proportionnelle à la quantité d'antigène dans le vaccin.

Une fois le titre de cette solution mère obtenue, l'Homme du Métier sait sans difficulté ajuster par dilution  
25 (exceptionnellement par concentration) le titre de la solution qu'il va utiliser dans la préparation des vaccins.

Selon l'invention, l'aliquot de solution mère contenant la quantité désirée d'antigènes est dilué à la quantité nécessaire et suffisante d'un tampon habituellement utilisé  
30 dans le domaine des vaccins, comme par exemple du tampon phosphate.

#### **Exemple 2 : Composition 1**

Le tableau suivant présente la composition selon l'invention qui est réalisée. Les quantités sont données en grammes.

|                                                    |       |
|----------------------------------------------------|-------|
| Triglycérides (Miglyol 810®)                       | 51,50 |
| Polysorbate 80 (Tween 80®)                         | 14,95 |
| Oléate de sorbitane (Span 80®)                     | 25,05 |
| Phase aqueuse antigénique (préparée à l'exemple 1) | 8,50  |

5

Dans un bécher, on mélange le Miglyol 810®, le Tween 80 et le span 80. On chauffe la phase huileuse obtenue au bain-marie à 40°C.

Parallèlement et séparément, on chauffe la phase aqueuse également à 40°C au bain-marie

On ajoute goutte-à-goutte la phase aqueuse dans la phase huileuse en homogénéisant avec un mélangeur à turbine (Rayneri 33300) tournant à 500 tours/minute.

Durant le mélange, les deux béchers sont maintenus à 40°C.

Une fois le mélange réalisé, on le retire du bain-marie et le laisse refroidir jusqu'à température ambiante.

Le titre cible en protéine MRP du produit fini est de 1,6. Le titre cible est un titre relatif à un antigène de référence ayant un titre théorique et arbitraire de 1. (1,6 signifie que le vaccin a un titre 1,6 fois plus élevé que la référence utilisée).

### Exemple 3 : Composition 2

25

La composition suivante est réalisée. Les quantités sont données en grammes :

|                                                    |      |
|----------------------------------------------------|------|
| perhydrosqualène (Cosbiol)                         | 73,0 |
| Oléate de sorbitane (span 80)                      | 8,4  |
| Oléate de sorbitane éthoxylé(Tween 80)             | 9,6  |
| Phase aqueuse antigénique (préparée à l'exemple 1) | 9,0  |

Le procédé de préparation du mélange est identique à celui décrit à l'exemple 2.

Le titre cible en protéine MRP du produit fini est de  
5 1,6.

#### Exemple 4 : Composition 3

La composition suivante est réalisée. Les quantités  
10 sont données en grammes :

|                                                    |       |
|----------------------------------------------------|-------|
| Triglycérides (Miglyol 810®)                       | 51,50 |
| Polysorbate 80 (Tween 80®)                         | 25,05 |
| Oléate de sorbitane (Span 80®)                     | 14,95 |
| Phase aqueuse antigénique (préparée à l'exemple 1) | 8,50  |

Dans un bécher on mélange le Miglyol 810®, le Tween 80® et le Span 80®. Ce mélange est stérilisé par chauffage à  
15 120°C pendant 30 minutes puis il est laissé refroidir à température ambiante.

La phase aqueuse contenant l'antigène est stérilisée par filtration sur membrane synthétique de 0,22 µm de porosité.

20 On chauffe parallèlement et séparément la phase huileuse obtenue ci-dessus et la phase aqueuse préparée à l'exemple 1 au bain-marie à 40°C.

Une fois que les 2 phases sont à la même température, on ajoute goutte-à-goutte la phase aqueuse dans la phase

huileuse en homogénéisant avec un mélangeur à turbine (Rayneri 33300) tournant à 500 tours/minute.

Durant le mélange, les deux béchers sont maintenus à température.

- 5 Une fois le mélange réalisé, on le retire du bain-marie et on le laisse refroidir à température ambiante.

Le titre cible en protéine MRP du produit fini est de 1,6.

- 10 **Exemple 5 : Comparaison de l'activité immunogène d'une composition selon l'invention avec l'activité immunogène de formulations selon l'art antérieur :**

- L'activité de la composition 1 de l'exemple 2 est comparée à celle d'autres compositions de l'art antérieur  
15 comprenant un ou des adjuvants décrits dans la littérature et connus de l'Homme du Métier.

Ainsi, 4 autres formulations (Témoins) sont réalisées, selon les compositions et modes opératoires suivants :

- 20 **Formulation Témoin 1 : émulsion de type huile dans eau classique :**

- Pour cette émulsion, les mêmes excipients décrits pour l'isotrope huileux de l'exemple 2 ont été utilisés dans des proportions différentes afin d'obtenir une émulsion très  
25 fine, pour un HLB critique de 11. Les quantités sont données en gramme.

|                                               |      |
|-----------------------------------------------|------|
| Triglycérides à chaîne moyenne (Miglyol 810®) | 20,0 |
| Polysorbate 80 (Tween 80®)                    | 9,4  |
| Sorbitane oléate (Span 80®)                   | 5,6  |
| Phase antigénique (obtenue à l'exemple 1)     | 65,0 |

Le procédé employé est le suivant :

La phase antigénique obtenue à l'exemple 1 est stérilisée par filtration sur membrane synthétique de 0.22  $\mu\text{m}$  de porosité.

- 5 Dans un bécher, on mélange le Miglyol®, le Tween 80® et le Span 80® et on stérilise le mélange par chauffage à 120°C pendant 30 minutes et on le laisse refroidir à température ambiante.

- 10 On chauffe alors la phase aqueuse (phase antigénique) et la phase huileuse séparément à 40°C dans un bain marie. Quand les 2 phases sont à la même température, on ajoute la phase aqueuse à la phase huileuse sous une agitation à 3000 tours/minutes.

- 15 Après l'ajout de la phase aqueuse, l'agitation est maintenue pendant 30 minutes.

**Formulation Témoin 2 : adjuvant du commerce huile dans eau (Montanide IMS, SEPPIC)**

- 20 Un adjuvant, le Montanide IMS, vendu par la société SEPPIC, (PARIS, France), prêt à l'emploi a été employé dans cette seconde préparation témoin. Les quantités sont données en gramme.

|                                                |       |
|------------------------------------------------|-------|
| Phase aqueuse contenant l'antigène (exemple 1) | 50,00 |
| Montanide IMS                                  | 50,00 |

- 25 La phase aqueuse obtenue à l'exemple 1 et l'adjuvant sont mélangés sous agitation à l'aide du homogénéiseur Rayneri T33300 tournant à 150 tours par minute durant 20 secondes.

- 30 L'ensemble est stérilisé par filtration sur membrane synthétique de 0.22  $\mu\text{m}$  de porosité.

**Formulation Témoin 3 : adjuvant du commerce eau/huile  
(Montanide ISA 763 VG, SEPPIC)**

Un autre adjuvant, le Montanide ISA 763 VG, vendu par la société SEPPIC (PARIS, FRANCE), prêt à l'emploi, a été  
5 utilisé dans cette troisième formulation témoin. Les quantités sont données en gramme.

|                                                |       |
|------------------------------------------------|-------|
| Phase aqueuse contenant l'antigène (exemple 1) | 30,00 |
| Montanide ISA 763 VG                           | 70,00 |

La phase aqueuse, obtenue à l'exemple 1, est filtrée  
10 sur filtre nylon 0.22 $\mu$ m, l'adjuvant sur filtre PTFE de 0.22  $\mu$ m de porosité, l'ensemble étant assemblé de manière aseptique

L'adjuvant est placé dans un bécher sous agitation à 800 tours/minute à l'aide d'un homogénéiseur Rayneri  
15 T33300.

La phase aqueuse antigénique est incorporée en une seule fois, sous agitation à 1200 tours/minute, maintenue durant 30 minutes.

20 **Formulation Témoin 4 : adjuvant du commerce eau dans huile (Montanide ISA 563 VG, SEPPIC)**

Un autre adjuvant, le Montanide ISA 563 VG, vendu par la société SEPPIC, (PARIS, FRANCE), prêt à l'emploi, a été  
25 utilisé dans cette quatrième formulation témoin. Les quantités sont données en gramme.

|                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| Phase aqueuse contenant l'antigène | 50,00 |
| Montanide ISA 563 VG               | 50,00 |

La partie aqueuse de la formulation est filtrée sur

filtre nylon 0.22 $\mu$ m, l'adjuvant sur filtres PTFE de 0.22  $\mu$ m de porosité, l'ensemble étant assemblé de manière aseptique.

L'adjuvant est placé dans un bécher et agité à 800  
5 tours/minute à l'aide d'un homogénéiseur Rayneri T33300. La phase aqueuse antigénique est incorporée en une seule fois, sous agitation à 1200 tours/minute, maintenue durant 15 minutes.

10 **Formulation témoin 5 : adjuvant LH selon la demande de brevet WO 01/40240**

Un autre adjuvant, le LH, adjuvant expérimental de la société COVACCINE (Lelystadt, PAYS BAS), prêt à l'emploi, a été utilisé dans cette dernière formulation témoin. Les  
15 quantités sont données en millilitres.

|                                                |       |
|------------------------------------------------|-------|
| Phase aqueuse contenant l'antigène (exemple 1) | 25,00 |
| Tampon salin (PBS)                             | 25,00 |
| LH                                             | 50,00 |

L'adjuvant aqueux LH est stérilisé par le fournisseur et reçu en l'état.

20 De manière aseptique, la phase antigénique aqueuse et le tampon salin sont mélangés par agitation magnétique pendant 5 à 10 min., puis l'adjuvant LH est ajouté très lentement (« en filet ») au mélange phase antigénique-tampon salin. L'agitation est maintenue pendant 10 min.

25 **Comparaison des titres MRP :**

Les titres en protéine MRP, mesurés comme décrit précédemment, des formulations témoin sont de 4 environ (en unités RP, (Relative Potency : Unité de mesure par Relative Potency Calculation Software, version 3.0, US Department of  
30 Agriculture).

Celui de la composition selon l'invention est de 1.01.

En effet, compte tenu de la faible quantité d'eau présente dans la composition selon l'invention, il n'est pas possible d'incorporer autant d'antigène que dans les  
5 formulations témoin, sauf à augmenter sa concentration dans la phase aqueuse, ce qui pouvait biaiser la mesure de la réponse immunitaire.

Or, malgré cette concentration largement inférieure, et ce de manière surprenante, les résultats décrits ci-après  
10 démontrent une activité immunogène largement supérieure de l'adjuvant selon l'invention.

**Protocole des études comparatives de l'activité immunogène et de la tolérance des compositions Témoin et de  
15 la composition selon l'invention :**

La comparaison de la tolérance et de l'activité immunogène est réalisée sur la souris.

L'activité immunogène de la composition 1 selon l'invention de l'exemple 2 a été comparée à celles des  
20 compositions Témoins en suivant le protocole expérimental suivant :

Des souris BALB/C (Fournisseur : Charles River) de 18-22 grammes à la réception ont reçu, à 2 semaines d'intervalle, 2 injections de 250µl par voie  
25 intrapéritonéale. Le sang a été prélevé une semaine après le rappel, lors de l'autopsie des souris. D'un point de vue sérologique, le taux d'anticorps anti-*Streptococcus suis* a été évalué par une méthode ELISA.

Les puits d'une micro-plaque sont tapissés avec  
30 l'antigène (surnageant acellulaire de la culture) puis saturés. Les sérums de souris ayant reçu le vaccin sont dilués et déposés dans la plaque. Un anticorps anti-souris marqué (conjugué à une enzyme) est ajouté. Le substrat/chromogène de l'enzyme est déposé et la réaction

colorée est mesurée. L'activité immunogène de chaque composition est alors définie par un titre moyen (en RP) correspondant à la moyenne des titres des souris composant le groupe.

5

La tolérance est appréciée selon trois critères : le taux de mortalité, l'activité de l'animal et l'aspect du pelage. La présence d'un résidu au point d'injection est également vérifiée.

10

### Résultats

- pouvoir immunogène

Les valeurs indiquées sont relatives : la valeur indiquée représente le pouvoir immunogène d'une composition selon l'invention rapporté au pouvoir immunogène du témoin n° 5 qui a servi de référence pour l'évaluation du pouvoir immunogène de chaque témoin testé.

| A    | B    | C    | D     | E    | F |
|------|------|------|-------|------|---|
| 26.8 | 0.60 | 0.33 | 15.33 | 8.53 | 1 |

20

A : Composition 1 selon l'invention

B : Témoin 1

C : Témoin 2

D : Témoin 3

E : Témoin 4

25

F : Témoin 5

Ces résultats montrent que la composition 1 (formule A) qui contient 4 et 6 fois moins d'antigène que les témoins 1 à 4, induit une réponse immunologique entre 2 et 80 fois plus élevée que celle induite par ces mêmes témoins.

30

- tolérance chez l'animal

| A  | B | C | D | E | F  |
|----|---|---|---|---|----|
| ++ | + | + | ± | ± | ++ |

++ : Excellent (aucun signe)

+ : bonne (pas de tuméfaction, pas de résidus, éventuellement le poil ébouriffé)

- 5        +/- : mauvaise (tuméfaction, présence de résidus de produits, poil ébouriffé)

10       Ces résultats montrent que la formule A (composition 1), tout comme la formule F de référence (composition 5), est parfaitement tolérée tant au niveau local que systémique, et beaucoup mieux tolérée que les 4 formules témoins.

## REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant au moins le mélange d'au moins une huile, d'au moins un tensioactif et  
5 d'une phase aqueuse comprenant elle-même au moins une substance active, ladite composition pharmaceutique n'étant pas sous la forme d'une émulsion mais sous la forme d'un isotrope huileux.

2. Composition selon la revendication 1,  
10 caractérisée en ce qu'elle présente une viscosité compatible avec une utilisation par injection

3. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la substance active est un actif biologique, notamment un antigène  
15 vivant, atténué ou inactivé.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un vaccin.

5. Composition selon la revendication 4,  
20 caractérisée en ce que la substance active est un antigène.

6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'antigène est d'origine virale, bactérienne, parasitaire ou tumorale.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisée en ce que l'antigène  
25 est naturel ou recombinant.

8. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que l'antigène est composé d'un microorganisme, éventuellement inactivé, ou de  
30 fractions dudit microorganisme.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une forte concentration en tensioactif et une faible concentration en eau.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend de 10% à 90% d'une huile, préférentiellement de 40% à 75% en poids, par rapport au poids de la composition totale.

5 11. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,5% et 20% pour cent, préférentiellement de 3% et 9%, d'eau, en poids, par rapport au poids de la composition totale.

10 12. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle comprend de 1% à 60%, préférentiellement de 16% et 45% de tensioactif, en poids, par rapport au poids de la composition totale.

15 13. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le rapport de la quantité d'huile à la quantité d'eau ne doit pas être inférieur à 1, préférentiellement pas inférieur à 5.

20 14. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que l'huile est choisie parmi les huiles minérales, les huiles non-minérales, comme l'huile de foie de morue, les lipides synthétiques, les huiles végétales, les triglycérides à chaînes moyennes et longues, ou encore les huiles  
25 terpéniques, et leurs mélanges.

15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'huile minérale est choisie parmi l'huile de paraffine, l'huile de vaseline.

30 16. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce que l'huile non-minérale est une huile végétale choisie parmi l'huile de soja, l'huile d'olive, l'huile de maïs, l'huile d'arachide, l'huile de graines de coton, l'huile de tournesol, l'huile de sésame, l'huile de ricin, l'huile d'amande.

17. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce que les triglycérides à chaînes moyennes et longues sont choisis parmi les triglycérides des acides caprylique/caprique.

5 18. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce que les huiles terpéniques sont choisies parmi le squalane et le squalène.

19. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisée en ce que l'on utilise  
10 un mélange d'huile.

20. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisée en ce que le tensioactif est choisi parmi les tensioactifs anioniques, cationiques, non ioniques ou amphotères.

15 21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce que le tensioactif est un tensioactif non ionique.

22. Composition selon la revendication 21, caractérisée en ce que le tensioactif est choisi parmi les  
20 polysorbates, les esters de sorbitane, particulièrement les esters de sorbitane et d'acide gras, les dérivés polyoxyéthylénés de l'huile de ricin, les dérivés polyoxyéthylénés de l'acide stéarique, les copolymères d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène ou poloxamères, les esters de  
25 sacharose et d'acide gras, les esters de glycol et d'acides gras, les mono-, di- et tri-esters d'acide gras et de glycérol, les esters de polyéthylèneglycols et d'acides gras, les esters de saccharose et d'acides gras.

23. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, caractérisée en ce que l'on utilise  
30 un mélange de tensioactifs.

24. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, caractérisée en ce que sa viscosité à température ambiante est comprise entre 5 et 150 mPa.s,

de préférence entre 5 et 100 mPa.s

25. Procédé de préparation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 24, caractérisé en ce que :

5       - dans une première étape, l'antigène est dissous ou dispersé dans la phase aqueuse dans laquelle sont également éventuellement incorporées les substances additionnelles ci-dessus décrites et le mélange est chauffé, par exemple au bain-marie, à une température comprise entre 30 et  
10   60°C, préférentiellement entre 35 et 45°C ;

      - dans une seconde étape, qui peut être concomitante à la première, le ou les tensioactifs sont mélangés à l'huile et le mélange est chauffé, par exemple au bain-marie, à une température comprise entre 30 et 60°C,  
15   préférentiellement entre 35 et 45°C ;

      - dans une troisième étape, la phase aqueuse est incorporée à la phase huileuse en employant un homogénéiseur ; et

      - dans une dernière étape, l'isotrope huileux obtenu  
20   est refroidi à température ambiante et stérilisé.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2005/002995

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/39

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2004/087204 A (PFIZER PRODUCTS INC;<br>DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; KLOSE, PAMELA,<br>KAY; KRE) 14 October 2004 (2004-10-14)<br>page 1, line 6 - line 11<br>page 19; example 1<br>page 20; example 4<br>claims 1-15 | 1-25                  |
| X         | EP 1 469 009 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC)<br>20 October 2004 (2004-10-20)<br>page 9, line 9 - line 12<br>page 17, line 33 - line 45<br>page 27 - page 28; example 5<br>-----<br>-/--                               | 1-25                  |



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 document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 March 2006

Date of mailing of the international search report

21/03/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Muller, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2005/002995

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | US 5 688 761 A (OWEN ET AL)<br>18 November 1997 (1997-11-18)<br>cited in the application<br>column 15, line 57 - column 16, line 2<br>column 16 - column 17; example 1<br>claims 1-22<br>-----                                                                                                                                                                                                 | 1-25                  |
| X         | CONSTANTINIDES P P ET AL: "FORMULATION<br>AND INTESTINAL ABSORPTION ENHANCEMENT<br>EVALUATION OF WATER-IN-OIL MICROEMULSIONS<br>INCORPORATING MEDIUM-CHAIN GLYCERIDES"<br>PHARMACEUTICAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US,<br>vol. 11, no. 10, 1994, pages 1385-1390,<br>XP002923381<br>ISSN: 0724-8741<br>page 1386, column 2, line 17 - line 22<br>page 1388, column 1, line 20 - line 24<br>----- | 1-25                  |
| X         | US 5 744 137 A (STONE ET AL)<br>28 April 1998 (1998-04-28)<br>cited in the application<br>column 4, line 59 - column 5, line 22<br>column 6 - column 7; example 3<br>-----                                                                                                                                                                                                                     | 1-25                  |
| X         | EP 0 781 559 A (JURIDICAL FOUNDATION, THE<br>CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE;<br>N) 2 July 1997 (1997-07-02)<br>page 5, line 13 - line 20<br>page 8; example 2<br>claims 1-10<br>-----                                                                                                                                                                                               | 1-25                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2005/002995

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2004087204                             | A | 14-10-2004          | AU 2004226591 A1           | 14-10-2004          |
|                                           |   |                     | CA 2521051 A1              | 14-10-2004          |
|                                           |   |                     | EP 1613346 A2              | 11-01-2006          |
| EP 1469009                                | A | 20-10-2004          | NONE                       |                     |
| US 5688761                                | A | 18-11-1997          | NONE                       |                     |
| US 5744137                                | A | 28-04-1998          | WO 9624374 A1              | 15-08-1996          |
| EP 0781559                                | A | 02-07-1997          | CN 1159914 A               | 24-09-1997          |
|                                           |   |                     | TW 410158 B                | 01-11-2000          |
|                                           |   |                     | US 5814321 A               | 29-09-1998          |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2005/002995

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b><br><b>A61K39/39</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                              |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                              |
| <b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b><br>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)<br><b>A61K</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                              |
| 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)<br><b>EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                              |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                              |
| Catégorie*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                | no. des revendications visées                                                                                                                |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | WO 2004/087204 A (PFIZER PRODUCTS INC;<br>DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; KLOSE, PAMELA,<br>KAY; KRE) 14 octobre 2004 (2004-10-14)<br>page 1, ligne 6 - ligne 11<br>page 19; exemple 1<br>page 20; exemple 4<br>revendications 1-15 | 1-25                                                                                                                                         |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | EP 1 469 009 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC)<br>20 octobre 2004 (2004-10-20)<br>page 9, ligne 9 - ligne 12<br>page 17, ligne 33 - ligne 45<br>page 27 - page 28; exemple 5<br>-----<br>-/--                                     | 1-25                                                                                                                                         |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents         </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe         </div> </div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                              |
| <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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</p> <p>*G* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> |                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                              |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée<br><br><div style="text-align: center; font-weight: bold;">8 mars 2006</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                               | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale<br><br><div style="text-align: center; font-weight: bold;">21/03/2006</div> |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale<br>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                               | Fonctionnaire autorisé<br><br><div style="text-align: center; font-weight: bold;">Muller, S</div>                                            |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2005/002995

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                                                                                                              | no. des revendications visées |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| X          | US 5 688 761 A (OWEN ET AL)<br>18 novembre 1997 (1997-11-18)<br>cité dans la demande<br>colonne 15, ligne 57 - colonne 16, ligne 2<br>colonne 16 - colonne 17; exemple 1<br>revendications 1-22                                                                                                                                                                                             | 1-25                          |
| X          | CONSTANTINIDES P P ET AL: "FORMULATION<br>AND INTESTINAL ABSORPTION ENHANCEMENT<br>EVALUATION OF WATER-IN-OIL MICROEMULSIONS<br>INCORPORATING MEDIUM-CHAIN GLYCERIDES"<br>PHARMACEUTICAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US,<br>vol. 11, no. 10, 1994, pages 1385-1390,<br>XP002923381<br>ISSN: 0724-8741<br>page 1386, colonne 2, ligne 17 - ligne 22<br>page 1388, colonne 1, ligne 20 - ligne 24 | 1-25                          |
| X          | US 5 744 137 A (STONE ET AL)<br>28 avril 1998 (1998-04-28)<br>cité dans la demande<br>colonne 4, ligne 59 - colonne 5, ligne 22<br>colonne 6 - colonne 7; exemple 3                                                                                                                                                                                                                         | 1-25                          |
| X          | EP 0 781 559 A (JURIDICAL FOUNDATION, THE<br>CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE;<br>N) 2 juillet 1997 (1997-07-02)<br>page 5, ligne 13 - ligne 20<br>page 8; exemple 2<br>revendications 1-10                                                                                                                                                                                        | 1-25                          |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2005/002995

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche |   | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|---|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| WO 2004087204                                   | A | 14-10-2004             | AU 2004226591 A1                        | 14-10-2004             |
|                                                 |   |                        | CA 2521051 A1                           | 14-10-2004             |
|                                                 |   |                        | EP 1613346 A2                           | 11-01-2006             |
| EP 1469009                                      | A | 20-10-2004             | AUCUN                                   |                        |
| US 5688761                                      | A | 18-11-1997             | AUCUN                                   |                        |
| US 5744137                                      | A | 28-04-1998             | WO 9624374 A1                           | 15-08-1996             |
| EP 0781559                                      | A | 02-07-1997             | CN 1159914 A                            | 24-09-1997             |
|                                                 |   |                        | TW 410158 B                             | 01-11-2000             |
|                                                 |   |                        | US 5814321 A                            | 29-09-1998             |