SPF Economie, PME, Classes Moyennes & Energie
Office de la Propriété intellectuelle

1022714 B1

Date de délivrance : 23/08/2016

# BREVET D'INVENTION

Date de priorité : 17/03/2014, 05/05/2014

Classification internationale : A61K 39/39

Numéro de dépôt : BE2015/5157

Date de dépôt : 17/03/2015

Titulaire :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
1330, RIXENSART
Belgique

Inventeur :

BRITO Luis
02139 MASSACHUSETTS
États-Unis

DODD Stephanie Kay
02139 MASSACHUSETTS
États-Unis

O'HAGAN Derek
02139 MASSACHUSETTS
États-Unis

SINGH Manmohan
27540 NORTH CAROLINA
États-Unis

## MELANGES D'HUILE/TENSIOACTIF POUR AUTO-EMULSIFICATION

Des émulsions huile dans l'eau avec des petites tailles de gouttelettes peuvent être formées sans nécessiter soit une microfluidisation soit un chauffage pour provoquer une inversion de phase, mais plutôt par un simple mélange d'une composition prémélangée d'huile et d'un composant tensioactif comprenant au moins un composant tensioactif avec du matériau aqueux. La valeur de BHL du composant tensioactif peut être choisie pour donner une composition qui, lors du mélange avec un volume en excès de matériau aqueux, forme spontanément une émulsion huile dans l'eau avec des gouttelettes d'huile submicroniques ayant un diamètre < 250 nm, approprié pour une stérilisation par filtration. Des diamètres de gouttelettes < 40 nm peuvent être

également obtenus.

# MELANGES D'HUILE/TENSIOACTIF POUR AUTO-EMULSIFICATION

Cette demande revendique les priorités de la demande de brevet européen No. 14160391.0, déposée le 17 mars 2014, et de la demande de brevet européen No. 14167083.6, déposée le 5 mai 2014, dont l'intégralité des deux demandes est incorporée dans la présente par référence pour tous les objets.

## Domaine technique

Cette invention concerne des procédés améliorés de fabrication d'émulsions huile dans l'eau ayant de petites tailles de particules de gouttelettes d'huile, par exemple, qui sont utiles en tant qu'adjuvants de vaccins.

## Contexte de l'état de l'art

L'adjuvant de vaccin connu sous le nom de « MF59 » [1-3] est une émulsion huile dans l'eau submicronique de squalène, de polysorbate 80 (également connu sous le nom de Tween 80), et de trioléate de sorbitane (également connu sous le nom de Span 85). Il peut également comprendre des ions citrate, par exemple, 10 mM de tampon citrate de sodium. La composition de l'émulsion en volume peut être d'environ 5 % de squalène, environ 0,5 % de Tween 80 et environ 0,5 % de Span 85. L'adjuvant et sa production sont décrits plus en détail dans les références 4 (chapitre 10), 5 (chapitre 12) et 6 (chapitre 19). Comme il est décrit dans la référence 7, il est fabriqué à l'échelle commerciale en dispersant du Span 85 dans le squalène, en dispersant du Tween 80 dans une phase aqueuse (tampon citrate), puis en mélangeant ces deux phases pour former une émulsion grossière qui est ensuite microfluidisée. L'émulsion est préparée à double concentration et elle est diluée au 1/1 (en volume) avec le vaccin considéré.

L'adjuvant en émulsion connu sous le nom de « AS03 » [8] est préparé en mélangeant un mélange huileux (constitué de squalène et d'α-tocophérol) avec une phase aqueuse (Tween 80 et tampon), ceci suivi d'une microfluidisation [9]. Il est également préparé à double concentration.

L'adjuvant en émulsion connu sous le nom de « AF03 » est préparé en refroidissant une émulsion eau dans l'huile préchauffée jusqu'à ce qu'elle croise sa température d'inversion de phase de l'émulsion, point auquel elle se convertit de façon thermoréversible en une émulsion huile dans l'eau [10]. L'émulsion « AF03 » comprend du squalène, de l'oléate de sorbitane, de l'éther cétostéarylique de polyoxyéthylène et du mannitol. Le mannitol, l'éther cétostéarylique et un tampon phosphate sont mélangés dans un récipient pour former une phase aqueuse, alors que l'ester de sorbitane et le squalène sont mélangés dans un autre récipient pour former un composant huileux. La phase aqueuse est ajoutée au composant huileux et le mélange est ensuite chauffé à ~60 °C et refroidi pour fournir l'émulsion finale. L'émulsion est préparée initialement avec une composition de 32,5 % de squalène, 4,8 % d'oléate de sorbitane, 6,2 % d'éther cétostéarylique de polyoxyéthylène et 6 % de mannitol, ce qui est au moins 4x la concentration finale.

Comme il a été démontré ci-dessus, les procédés antérieurs connus de l'état de l'art pour produire des émulsions appropriées pour une utilisation en tant qu'adjuvants nécessitent soit des procédés mécaniques vigoureux (comme une homogénéisation et une microfluidisation) soit des températures relativement élevées (par exemple, dans un procédé de température d'inversion de phase) afin d'obtenir les petites tailles de gouttelettes d'huile requises pour l'activité de l'adjuvant. L'utilisation de ces procédés est

associée à plusieurs inconvénients, par exemple, des coûts de fabrication élevés.

Résumé de l'invention

Par conséquent, un objet de la présente invention est de proposer des procédés autres et améliorés (par exemple, plus simples) pour la production d'émulsions huile dans l'eau submicroniques. En particulier, un objet de la présente invention est de proposer des procédés qui sont appropriés pour une utilisation à une échelle commerciale et qui ne nécessitent pas l'utilisation de procédés impliquant un traitement mécanique vigoureux ou des températures significativement élevées.

Les inventeurs ont découvert que les émulsions huile dans l'eau avec des petites tailles de gouttelettes peuvent être formées sans nécessiter ni de microfluidisation ni de chauffage pour provoquer une inversion de phase, mais plutôt par un simple mélange d'une composition prémélangée d'huile et de tensioactif avec un matériau aqueux. En général, si la composition d'huile/tensioactif contient un volume plus important de tensioactif que d'huile alors, lors du mélange avec un volume en excès de matériau aqueux, le système forme spontanément une émulsion huile dans l'eau avec des gouttelettes d'huile submicroniques (et même avec des gouttelettes ayant un diamètre < 250 nm, approprié pour une stérilisation par filtration). Ces émulsions présentent une activité d'adjuvant même si elles ont des compositions différentes des adjuvants connus.

Dans un premier aspect, la présente invention propose une composition d'huile/tensioactif pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm (par exemple, entre 40 et 250 nm, entre 90

et 240 nm, par exemple de 100 à 220 nm), ladite composition comprenant

au moins une huile biocompatible, métabolisable (comme le squalène) ; et

un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 2,5 à 9,0, et où la composition d'huile/tensioactif est substantiellement dépourvue de composants aqueux. Cette composition d'huile/tensioactif contraste avec la composition de squalène/trioléate de sorbitane qui est utilisée pour fabriquer le MF59 (voir la figure 1 de la référence 11) dans laquelle le composant tensioactif a une BHL inférieure à 2.

Dans un deuxième aspect, la présente invention propose une émulsion huile dans l'eau comprenant la composition d'huile/tensioactif selon le premier aspect de l'invention en combinaison avec une phase aqueuse, où ladite émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm. En général, lors d'une comparaison à des émulsions microfluidisées ayant des tailles et des distributions de gouttelettes d'huile équivalentes, de telles émulsions présenteront des rapports en poids de tensioactif/huile légèrement supérieurs, par exemple, plus de 1/4,3 pour une émulsion similaire au MF59, et de plus de 1/4,7 pour une émulsion similaire au AS03.

Dans un troisième aspect, la présente invention propose un procédé de formation d'une émulsion huile dans l'eau comprenant

au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 2,5 à 9,0 et où l'émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm ;

ledit procédé comprenant :

la fourniture d'une composition d'huile/tensioactif selon le premier aspect de l'invention ;

la fourniture d'une phase aqueuse ;

la combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée ; et

le mélange léger de la composition diluée pour former une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm.

Dans un quatrième aspect, la présente invention propose une composition d'huile/tensioactif pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm, ladite composition comprenant

au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9,0 à 14,0 et où la composition d'huile/tensioactif est substantiellement dépourvue de composants aqueux.

Dans un cinquième aspect, la présente invention propose une émulsion huile dans l'eau comprenant la composition d'huile/tensioactif selon le quatrième aspect de l'invention en combinaison avec une phase aqueuse, où ladite émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm.

Dans un sixième aspect, la présente invention propose un procédé de formation d'une émulsion huile dans l'eau comprenant

au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9,0 à 14,0 et où l'émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm ;

ledit procédé comprenant :

la fourniture d'une composition d'huile/tensioactif selon le quatrième aspect de l'invention ;

la fourniture d'une phase aqueuse ;

la combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée ; et

le mélange léger de la composition diluée pour former une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm.

L'invention propose également des émulsions huile dans l'eau de l'invention pour une utilisation en tant qu'adjuvants.

Dans un autre aspect, la présente invention propose une composition immunogène comprenant une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention, et un composant antigène.

Dans un aspect, la présente invention propose un procédé de préparation d'une composition immunogène, ledit procédé comprenant le mélange d'une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention, avec un composant antigène.

Dans un autre aspect, la présente invention propose un kit comprenant :

une composition d'huile/tensioactif selon la présente invention ;

une phase aqueuse ; et éventuellement

des instructions pour combiner la composition d'huile/tensioactif et la phase aqueuse.

Selon des modes de réalisation de l'invention, la composition d'huile/tensioactif et/ou la phase aqueuse peuvent comprendre un composant antigène.

Dans un autre aspect, l'invention propose un procédé de préparation d'un kit comprenant les étapes suivantes : fourniture d'une composition d'huile/tensioactif selon la présente invention ; et de conditionnement de la composition dans un kit en tant que composant de kit conjointement avec une phase aqueuse ; et éventuellement le conditionnement d'un composant antigène dans le kit en tant que composant de kit conjointement avec la composition d'huile/tensioactif et la phase aqueuse.

La présente invention propose également un kit comprenant : une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention ; et un composant antigène.

La présente invention propose en outre un procédé de préparation d'un kit comprenant les étapes suivantes : la fourniture d'une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention ; et le conditionnement de l'émulsion dans un kit en tant que composant de kit conjointement avec un composant antigène séparé.

La présente invention propose également un matériau sec (par exemple, un lyophilisat) qui, lorsqu'il est reconstitué avec une phase aqueuse, fournit une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention. Tel qu'utilisé dans la présente, « matériau sec » et « matériau séché » signifient un matériau qui est substantiellement dépourvu d'eau ou substantiellement dépourvu d'une phase aqueuse.

L'invention propose également un procédé de préparation d'une émulsion séchée, comprenant : (i) l'obtention d'une

émulsion huile dans l'eau de l'invention ; et (ii) le séchage de l'émulsion pour fournir l'émulsion séchée. Ce matériau séché peut être reconstitué dans une émulsion de l'invention en le combinant avec un support aqueux approprié. Les techniques de séchage appropriées sont décrites ci-dessous.

La présente invention propose également un kit pour préparer une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention, où le kit comprend :

une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention sous forme séchée ; et

une phase aqueuse.

Des modes de réalisation de la présente invention sont présentés dans les clauses numérotées suivantes :

1. Une composition d'huile/tensioactif pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm, ladite composition comprenant

   (i) au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

   (ii) un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

   où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 2,5 à 9,0, et où la composition d'huile/tensioactif est substantiellement dépourvue de composants aqueux.

2. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 1, dans laquelle le composant tensioactif a une valeur de BHL de 3,3 à 8,4.

3. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 1 ou la clause 2, dans laquelle le rapport en volume de l'huile/composant tensioactif est de 1/1 à 1/10.

4. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 1 à 3, dans laquelle le composant tensioactif comprend au moins deux tensioactifs.

5. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 1 à 4, dans laquelle le composant tensioactif comprend un premier tensioactif ayant une valeur de BHL inférieure à 10 et un second tensioactif ayant une valeur de BHL d'au moins 10.

6. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 1 à 5, dans laquelle le composant tensioactif comprend un premier tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 4 et un second tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17.

7. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 1 à 6, où la composition d'huile/ tensioactif comprend du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80.

8. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 7, dans laquelle le % en volume combiné du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 est de 50 à 90 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.

9. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 7 ou la clause 8, dans laquelle le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 est de 20 à 70 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.

10. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 7 à 9, dans laquelle le % en volume combiné du squalène et du trioléate de sorbitane est de 60 à 90 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.

11. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 7, dans laquelle le % en volume combiné du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 est de 50 à 90 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif.

12. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 7 ou la clause 11, dans laquelle le % en volume combiné du

squalène et du polysorbate 80 est de 20 à 70 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif.

13. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 7, 11 ou 12, dans laquelle le % en volume combiné du squalène et du trioléate de sorbitane est de 60 à 90 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/ tensioactif.

14. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 1 à 13, choisie parmi :

| Squalène (% en volume) | Trioléate de sorbitane (% en volume) | Polysorbate 80 (% en volume) |
|---|---|---|
| 40 | 40 | 20 |
| 30 | 40 | 30 |
| 50 | 30 | 20 |
| 40 | 30 | 30 |

15. Une émulsion huile dans l'eau comprenant la composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 1 à 14 en combinaison avec une phase aqueuse, où ladite émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm.

16. L'émulsion huile dans l'eau selon la clause 15, où l'émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile de 100 à 220 nm.

17. Un procédé de formation d'une émulsion huile dans l'eau comprenant

(i) au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

(ii) un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

dans lequel le composant tensioactif a une valeur de BHL de 2,5 à 9,0 et où l'émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm ;

ledit procédé comprenant :

a) la fourniture d'une composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 1 à 14 ;

b) la fourniture d'une phase aqueuse ;

c) la combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée ; et

d) le mélange léger de la composition diluée pour former une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm.

18. Le procédé selon la clause 17, dans lequel l'émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile de 100 à 220 nm.

19. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 17 à 18, où le procédé est réalisé en l'absence d'agitation mécanique.

20. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 17 à 19, dans lequel le mélange léger de la composition diluée comprend l'inversion du mélange à la main ou par agitation ou par un dispositif mécanique.

21. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 17 à 20, dans lequel l'étape de combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée comprend :

(i) le mélange de volumes égaux de la composition d'huile/tensioactif et de la phase aqueuse ; et

(ii) la dilution du mélange de la composition d'huile/tensioactif et de la phase aqueuse avec un autre volume de phase aqueuse pour former une composition diluée.

22. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 17 à 21, dans lequel l'étape de combinaison de la composition

d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée comprend l'addition de la composition d'huile/tensioactif dans la phase aqueuse.

23. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 17 à 22, dans lequel la composition d'huile/tensioactif est ajoutée à un volume en excès de la phase aqueuse à une température inférieure à 55 °C.

24. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 17 à 23, où le procédé prend place à une température d'environ 25 °C.

25. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 17 à 24, dans lequel le rapport de la phase aqueuse sur la composition d'huile/tensioactif dans la composition diluée est de 10/1 à 50/1 en volume, de préférence 20/1 à 40/1 en volume.

26. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 17 à 25, où ledit procédé comprend en outre l'étape de soumission de l'émulsion huile dans l'eau à une stérilisation par filtration.

27. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 17 à 26, dans lequel la phase aqueuse est substantiellement dépourvue de tensioactif(s) et/ou d'huile(s).

28. L'émulsion huile dans l'eau selon la clause 15 ou la clause 16, pour une utilisation en tant qu'adjuvant.

29. Une composition immunogène comprenant une émulsion huile dans l'eau selon la clause 15 ou la clause 16, et un composant antigène.

30. Un procédé de préparation d'une composition immunogène comprenant le mélange d'une émulsion huile dans l'eau selon la clause 15 ou la clause 16, avec un composant antigène.

31. Un kit comprenant :

(i) une composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 1 à 14 ;

(ii) une phase aqueuse ; et éventuellement

(iii) des instructions pour combiner la composition d'huile/tensioactif et la phase aqueuse.

32. Le kit selon la clause 31, dans lequel la composition d'huile/tensioactif comprend en outre un composant antigène.

33. Le kit selon la clause 31 ou la clause 32, dans lequel la phase aqueuse comprend en outre un composant antigène.

34. Un procédé de préparation d'un kit comprenant les étapes suivantes :

(i) la fourniture d'une composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 1 à 14 ; et

(ii) le conditionnement de la composition dans un kit en tant que composant de kit conjointement avec une phase aqueuse.

35. Un procédé de préparation d'un kit selon la clause 34, comprenant en outre :

(iii) le conditionnement d'un composant antigène dans le kit en tant que composant de kit conjointement avec la composition d'huile/tensioactif et la phase aqueuse.

36. Un kit comprenant :

(i) une émulsion huile dans l'eau selon la clause 15 ou la clause 16 ; et

(ii) un composant antigène.

37. Un procédé de préparation d'un kit comprenant les étapes suivantes :

(i) la fourniture d'une émulsion huile dans l'eau selon la clause 15 ou la clause 16 ; et

(ii) le conditionnement de l'émulsion dans un kit en tant que composant de kit conjointement avec un composant antigène séparé.

38. Un matériau séché qui, lorsqu'il est reconstitué avec une phase aqueuse, fournit une émulsion huile dans l'eau selon la clause 15 ou la clause 16.

39. Le matériau séché selon la clause 38, comprenant en outre un composant antigène sous forme séchée.

40. Le matériau séché selon la clause 38 ou la clause 39, comprenant en outre un ou plusieurs stabilisants de lyophilisation.

41. Un kit pour la préparation d'une émulsion huile dans l'eau selon la clause 15 ou la clause 16, où le kit comprend :

(i) une émulsion huile dans l'eau selon la clause 15 ou la clause 16 sous forme séchée ; et

(ii) une phase aqueuse.

42. Le kit selon la clause 41, dans lequel l'émulsion huile dans l'eau sous forme séchée est combinée à un composant antigène sous forme séchée.

43. Une composition d'huile/tensioactif pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm, ladite composition comprenant

(i) au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

(ii) un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9,0 à 14,0 et où la composition d'huile/tensioactif est substantiellement dépourvue de composants aqueux.

44. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 43, dans laquelle le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9,3 à 13,5.

45. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 43 ou la clause 44, dans laquelle le rapport en volume de l'huile/composant tensioactif est de 1/1 à 1/10.
46. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 43 à 45, dans laquelle le composant tensioactif comprend au moins deux tensioactifs.
47. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 43 à 46, dans laquelle le composant tensioactif comprend un premier tensioactif ayant une valeur de BHL inférieure à 10 et un second tensioactif ayant une valeur de BHL d'au moins 10.
48. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 43 à 47, dans laquelle le composant tensioactif comprend un premier tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 4 et un second tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17.
49. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 43 à 48, où la composition d'huile/tensioactif comprend du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80.
50. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 49, dans laquelle le % en volume combiné du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 est de 60 à 90 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.
51. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 49 ou la clause 50, dans laquelle le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 est de 70 à 90 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.
52. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 49 à 51, dans laquelle le % en volume combiné du squalène et du trioléate de sorbitane est de 20 à 60 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.

53. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 49, dans laquelle le % en volume combiné du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 est de 60 à 90 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif.
54. La composition d'huile/tensioactif selon la clause 49 ou la clause 53, dans laquelle le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 est de 70 à 90 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif.
55. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 49, 53 ou 54, dans laquelle le % en volume combiné du squalène et du trioléate de sorbitane est de 20 à 60 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 dans la composition d'huile/ tensioactif.
56. La composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 43 à 55, choisie parmi :

| Squalène (% en volume) | Trioléate de sorbitane (% en volume) | Polysorbate 80 (% en volume) |
|---|---|---|
| 30 | 30 | 40 |
| 40 | 20 | 40 |
| 30 | 20 | 50 |
| 10 | 10 | 80 |

57. Une émulsion huile dans l'eau comprenant la composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 43 à 56 en combinaison avec une phase aqueuse, où ladite émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm.
58. L'émulsion huile dans l'eau selon la clause 57, où l'émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 30 nm.

59. Un procédé de formation d'une émulsion huile dans l'eau comprenant

(i) au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

(ii) un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9,0 à 14,0 et où l'émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm ;

ledit procédé comprenant :

a) la fourniture d'une composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des clauses 43 à 56,

b) la fourniture d'une phase aqueuse ;

c) la combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée ; et

d) le mélange léger de la composition diluée pour former une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm.

60. Le procédé selon la clause 59, dans lequel l'émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 30 nm.

61. Le procédé selon la clause 59 ou la clause 60, où le procédé est réalisé en l'absence d'agitation mécanique.

62. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 59 à 61, dans lequel le mélange léger de la composition diluée comprend l'inversion du mélange à la main ou par agitation ou par un dispositif mécanique.

63. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 59 à 62, dans lequel l'étape de combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée comprend :

(i) le mélange de volumes égaux de la composition d'huile/tensioactif et de la phase aqueuse ; et

(ii) la dilution du mélange de la composition d'huile/tensioactif et de la phase aqueuse avec un autre volume de phase aqueuse pour former une composition diluée.

64. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 59 à 63, dans lequel l'étape de combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée comprend l'addition de la composition d'huile/tensioactif dans la phase aqueuse.

65. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 59 à 64, dans lequel la composition d'huile/tensioactif est ajoutée à un volume en excès de la phase aqueuse à une température inférieure à 55 °C.

66. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 59 à 65, où le procédé prend place à une température d'environ 25 °C.

67. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 59 à 66, dans lequel le rapport de la phase aqueuse sur la composition d'huile/tensioactif dans la composition diluée est de 10/1 à 50/1 en volume, de préférence de 20/1 à 40/1 en volume.

68. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 59 à 67, où ledit procédé comprend en outre l'étape de soumission de l'émulsion huile dans l'eau à une stérilisation par filtration.

69. Le procédé selon l'une quelconque des clauses 59 à 68, dans lequel la phase aqueuse est substantiellement dépourvue de tensioactif(s) et/ou d'huile(s).

La composition d'huile/tensioactif

Selon l'invention, les procédés de préparation d'émulsions font usage d'une composition d'huile/tensioactif. Cette composition est un mélange qui comprend au moins une

huile et un composant tensioactif comprenant au moins un tensioactif, dont des exemples sont présentés plus en détail ci-dessous. L'huile/les huiles et le(s) tensioactif(s) sont idéalement miscibles l'un avec l'autre dans la composition. La composition peut être une dispersion d'huile/tensioactif. Si les phases de l'huile et du tensioactif sont totalement miscibles l'une dans l'autre, la composition sera une solution d'huile/tensioactif.

Parce que les émulsions de l'invention sont prévues pour une utilisation pharmaceutique, l'huile/les huiles et le(s) tensioactifs dans la composition seront généralement métabolisables (biodégradables) et biocompatibles. Si seulement l'un de ces deux composants est métabolisable et biocompatible, ce devra être l'huile/les huiles.

La composition peut comprendre un ou plusieurs composants en plus de l'huile/des huiles et du/des tensioactif(s), mais dans certains modes de réalisation, l'huile/les huiles et le(s) tensioactifs constituent substantiellement la totalité de la composition. Lorsque d'autres composants sont compris, ils peuvent former jusqu'à 15 % de la composition (en poids), de préférence 1 à 15 % de la composition (en poids), de manière davantage préférée 5 à 10 %. Par exemple, dans certains modes de réalisation, la composition comprend un ou plusieurs agents pharmacologiquement actifs, qui seront habituellement lipophiles. De tels agents lipophiles comprennent, mais n'y sont pas limités, des vitamines (par exemple, les vitamines A, D, E et K), des caroténoïdes (par exemple, le β-carotène), des acides gras (par exemple, l'acide arachidonique, l'acide éicosapentaénoïque, l'acide docosahexaénoïque), des pyrimidines (par exemple, la 5-hydroxy-4,6-diméthyl-2-(6-phénylhexyl)aminopyrimidine), des ansamitocines, des antagonistes du récepteur de l'angiotensine II (par exemple, le candésartan cilexétil), et

des immunopotentialisateurs (par exemple, des muramyl-dipeptides). Les agents lipophiles types ont une valeur logP positive (coefficient de partage mesuré dans du 1-octanol et de l'eau) à pH 7,4 et 37 °C, par exemple, ils peuvent avoir une valeur logP ≥ 1, ≥ 2, ≥ 3, ≥ 4, ≥ 5, ≥ 6, ≥ 7, etc.

Dans certains modes de réalisation, la composition peut comprendre un cholestérol et/ou un phospholipide. Les classes appropriées de phospholipides comprennent, mais n'y sont pas limités, les phosphatidyléthanolamines, les phosphatidyl-cholines, les phosphatidylsérines, les phosphatidylglycérols, etc.

Dans des modes de réalisation de l'invention, la composition d'huile/tensioactif peut comprendre un composant antigène.

Dans un premier aspect, la présente invention propose une composition d'huile/tensioactif pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm, ladite composition comprenant

au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 2,5 à 9,0, et où la composition d'huile/tensioactif est substantiellement dépourvue de composants aqueux.

Dans un quatrième aspect, la présente invention propose une composition d'huile/tensioactif pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm, ladite composition comprenant

au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9,0 à 14,0 et où la composition d'huile/tensioactif est substantiellement dépourvue de composants aqueux.

Le rapport en volume de l'huile/composant tensioactif dans la composition d'huile/tensioactif de la présente invention est de préférence de 1/1 à 1/10.

De préférence, la composition d'huile/tensioactif de la présente invention comprend une huile, un tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17, et un tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5. De manière davantage préférée, la composition d'huile/tensioactif de la présente invention est constituée essentiellement d'une huile, d'un tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17, et d'un tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5. Dans certains modes de réalisation, la composition d'huile/tensioactif est constituée d'une huile, d'un tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17, et d'un tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5.

Selon des modes de réalisation du premier aspect de la présente invention dans lesquels la composition d'huile/ tensioactif comprend une huile, un tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17, et un tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 :

le % en volume combiné du tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/tensioactif peut être de 50 à 90 %, de préférence 50 à 70 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné de l'huile et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 peut être de 20 à 70 %, de préférence 60 à 70 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné de l'huile et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 peut être de 60 à 90 %, de préférence 70 à 80 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.

De préférence, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du premier aspect de la présente invention satisfont au moins deux de ces trois critères. De manière davantage préférée, les compositions d'huile/ tensioactif selon des modes de réalisation du premier aspect de l'invention satisfont les trois de ces critères.

Selon des modes de réalisation du premier aspect de la présente invention dans lesquels la composition d'huile/ tensioactif comprend une huile, un tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17, et un tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 :

le % en volume combiné du tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/tensioactif peut être de 50 à 90 %, de préférence 50 à 70 % du volume total d'huile, de tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et de tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné de l'huile et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 peut être de 20 à 70 %, de préférence 60 à 70 % du volume total d'huile, de tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et de tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/ tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné de l'huile et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 peut être de 60 à 90 %, de préférence 70 à 80 % du volume total d'huile, de tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et de tensioactif ayant une

valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/tensioactif.

De préférence, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du premier aspect de la présente invention satisfont au moins deux de ces trois critères. De manière davantage préférée, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du premier aspect de l'invention satisfont les trois de ces critères.

Dans un mode de réalisation particulier, la composition d'huile/tensioactif de la présente invention comprend du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80. Dans un autre mode de réalisation, la composition d'huile/tensioactif de la présente invention comprend essentiellement du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80. Dans des modes de réalisation de la présente invention, la composition d'huile/tensioactif est constituée de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80.

Selon des modes de réalisation du premier aspect de la présente invention dans lesquels la composition d'huile/tensioactif comprend du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 :

le % en volume combiné du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif peut être de 50 à 90 %, de préférence 50 à 70 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 peut être de 20 à 70 %, de préférence 60 à 70 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné du squalène et du trioléate de sorbitane peut être de 60 à 90 %, de préférence 70 à 80 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.

De préférence, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du premier aspect de la présente

invention satisfont au moins deux de ces trois critères. De manière davantage préférée, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du premier aspect de l'invention satisfont les trois de ces critères.

Selon des modes de réalisation du premier aspect de la présente invention dans lesquels la composition d'huile/tensioactif comprend du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 :

le % en volume combiné du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 peut être de 50 à 90 %, de préférence 50 à 70 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 peut être de 20 à 70 %, de préférence 60 à 70 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné du squalène et du trioléate de sorbitane peut être de 60 à 90 %, de préférence 70 à 80 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif.

De préférence, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du premier aspect de la présente invention satisfont au moins deux de ces trois critères. De manière davantage préférée, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du premier aspect de l'invention satisfont les trois de ces critères.

Selon certains modes de réalisation du premier aspect de la présente invention, la composition d'huile/tensioactif est choisie parmi :

| | Squalène (% en volume) | Trioléate de sorbitane (% en volume) | Polysorbate 80 (% en volume) |
|---|---|---|---|
| 5 | 40 | 40 | 20 |
| 6 | 30 | 40 | 30 |
| 10 | 50 | 30 | 20 |
| 11 | 40 | 30 | 30 |

Selon des modes de réalisation du quatrième aspect de la présente invention dans lesquels la composition d'huile/tensioactif comprend une huile, un tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17, et un tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 :

le % en volume combiné du tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/tensioactif peut être de 60 à 90 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif : et/ou

le % en volume combiné de l'huile et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/tensioactif peut être de 70 à 90 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné de l'huile et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 dans la composition d'huile/tensioactif peut être de 20 à 60 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.

De préférence, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du quatrième aspect de la présente invention satisfont au moins deux de ces trois critères. De manière davantage préférée, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du quatrième aspect de l'invention satisfont les trois de ces critères.

Selon des modes de réalisation du quatrième aspect de la présente invention dans lesquels la composition d'huile/tensioactif comprend une huile, un tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17, et un tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 :

le % en volume combiné du tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 peut être de 60 à 90 % du volume total d'huile, de

tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et de tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné de l'huile et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 peut être de 70 à 90 % du volume total d'huile, de tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et de tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné de l'huile et du tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 peut être de 20 à 60 % du volume total d'huile, de tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et de tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/tensioactif.

De préférence, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du quatrième aspect de la présente invention satisfont au moins deux de ces trois critères. De manière davantage préférée, les compositions d'huile/ tensioactif selon des modes de réalisation du quatrième aspect de l'invention satisfont les trois de ces critères.

Selon des modes de réalisation du quatrième aspect de la présente invention dans lesquels la composition d'huile/tensioactif comprend du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 :

le % en volume combiné du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 peut être de 60 à 90 % du volume total de la composition d'huile/ tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 est de 70 à 90 % du volume total de la composition d'huile/ tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné du squalène et du trioléate de sorbitane est de 20 à 60 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif.

De préférence, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du quatrième aspect de la présente invention satisfont au moins deux de ces trois critères. De manière davantage préférée, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du quatrième aspect de l'invention satisfont les trois de ces critères.

Selon des modes de réalisation du quatrième aspect de la présente invention dans lesquels les compositions d'huile/tensioactif comprennent du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 :

le % en volume combiné du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80 est de 60 à 90 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 est de 70 à 90 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif ; et/ou

le % en volume combiné du squalène et du trioléate de sorbitane est de 20 à 60 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif.

De préférence, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du quatrième aspect de la présente invention satisfont au moins deux de ces trois critères. De manière davantage préférée, les compositions d'huile/tensioactif selon des modes de réalisation du quatrième aspect de l'invention satisfont les trois de ces critères.

Selon certains modes de réalisation du quatrième aspect de la présente invention, la composition d'huile/tensioactif est choisie parmi :

| | Squalène (% en volume) | Trioléate de sorbitane (% en volume) | Polysorbate 80 (% en volume) |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| 12 | 30 | 30 | 40 |
| 19 | 40 | 20 | 40 |
| 20 | 30 | 20 | 50 |
| 29 | 10 | 10 | 80 |

Dans des modes de réalisation de l'invention, la composition d'huile/tensioactif est substantiellement dépourvue de composants aqueux.

Le(s) composant(s) huileux

La composition comprend une ou plusieurs huiles. L'huile/les huiles appropriées comprennent celles provenant, par exemple, d'une source animale (comme un poisson) ou végétale. Les sources pour les huiles végétales comprennent les noix, les graines et les grains. L'huile d'arachide, l'huile de soja, l'huile de noix de coco, et l'huile d'olive, les plus couramment disponibles, exemplifient les huiles de noix. L'huile de jojoba peut être utilisée, par exemple, obtenue à partir de la fève de jojoba. Les huiles de graines comprennent l'huile de carthame, l'huile de graines de coton, l'huile de graines de tournesol, l'huile de graines de sésame et analogues. Dans le groupe des grains, l'huile de maïs est la plus facilement disponible, mais l'huile d'autres grains de céréales comme le blé, l'avoine, le seigle, le riz, le teff, le triticale et analogues peut être également utilisée. Les esters d'acides gras à 6 à 10 carbones du glycérol et du 1,2-propanediol, alors qu'ils n'existent pas à l'état naturel dans les huiles de graines, peuvent être préparés par hydrolyse, séparation et estérification de matériaux appropriés en démarrant à partir des huiles de noix et de graines. Les graisses et les huiles de laits de mammifères sont métabolisables et ainsi peuvent être utilisées. Les procédures pour la séparation, la purification, la saponification et les

autres moyens nécessaires pour obtenir des huiles pures de source animale sont bien connues de l'état de l'art.

La plupart des poissons contiennent des huiles métabolisables qui peuvent être facilement récupérées. Par exemple, l'huile de foie de morue, les huiles de foie de requin, et l'huile de baleine comme le spermaceti exemplifient plusieurs des huiles de poissons qui peuvent être utilisées dans la présente. Un certain nombre d'huiles à chaîne ramifiée sont synthétisées par biochimie en unités d'isoprène à 5 carbones, et elles sont généralement appelées terpénoïdes. Une huile préférée pour une utilisation dont fait l'invention est le squalène, qui est un terpénoïde insaturé ramifié ($[(CH_3)_2C[=CHCH_2CH_2C(CH_3)]_2=CHCH_2-]_2$ ; $C_{30}H_{50}$ ; 2,6,10,15,19,23-hexaméthyl-2,6,10,14,18,22-tétracosahexaène ; CAS RN 7683-64-9). Le squalane, l'analogue saturé au squalène, peut être également utilisé. Les huiles de poisson, comprenant du squalène et du squalane, sont facilement disponibles auprès de sources commerciales ou peuvent être obtenues par des procédés connus de l'état de l'art.

D'autres huiles utiles sont les tocophérols, particulièrement en combinaison avec du squalène. Lorsque la phase huileuse d'une émulsion comprend un tocophérol, l'un quelconque des α, β, γ, δ, ε ou ξ tocophérols peut être utilisé, mais les α-tocophérols sont préférés. Le D-α-tocophérol et le DL-α-tocophérol peuvent être tous les deux utilisés. Un α-tocophérol préféré est le DL-α-tocophérol. Une combinaison huileuse comprenant du squalène et un tocophérol (par exemple, le DL-α-tocophérol) peut être utilisée.

La composition de la présente invention peut comprendre une combinaison d'huiles, par exemple, du squalène et au moins une autre huile. Lorsque la composition comprend plus d'une huile, celles-ci peuvent être présentes dans divers rapports,

par exemple entre 1/5 et 5/1 en volume, par exemple entre 1/2 et 2/1, comme à des volumes égaux.

Au sein de la composition, la quantité totale d'huile idéalement ne constitue pas plus de 50 % (en volume). Comme il est montré dans les exemples, une teneur supérieure en huile tend à ne pas favoriser l'émulsification spontanée. Dans un mode de réalisation particulier, les quantités préférées d'huile dans la composition sont entre 10 et 50 %, de manière davantage préférée entre 25 et 50 %. Une teneur en huile dans la composition d'environ 20 %, ou 30 % ou 40 % (en volume) est particulièrement utile.

Au sein de la composition, le rapport de la quantité totale d'huile sur la quantité totale de tensioactif idéalement n'est pas de plus de 1/1. Dans un mode de réalisation particulier, le tensioactif est présent dans un volume en excès par rapport à l'huile. Comme il est montré dans les exemples, une teneur en excès d'huile tend à ne pas favoriser l'émulsification spontanée. Dans un mode de réalisation particulier, un rapport en volume huile/ tensioactif est de 1/1 à 1/10. L'huile/les huiles dans les compositions et les émulsions de l'invention seront généralement métabolisables (biodégradables) et biocompatibles.

Le(s) composant(s) tensioactif(s)

La composition comprend un composant tensioactif comprenant un ou plusieurs tensioactifs. Dans un mode de réalisation particulier, le composant tensioactif comprend au moins deux tensioactifs. Dans un autre mode de réalisation, le composant tensioactif est constitué de deux tensioactifs. Le composant tensioactif dans les compositions et les émulsions de l'invention sera généralement métabolisable (biodégradable) et biocompatible.

Les tensioactifs peuvent être classés par leur « BHL » (balance hydrophile/lipophile de Griffin), où une BHL située dans la plage de 1 à 10 signifie généralement que le tensioactif est plus soluble dans l'huile que dans l'eau, et une BHL située dans la plage de 10 à 20 signifie que le tensioactif est plus soluble dans l'eau que dans l'huile. Les valeurs de BHL sont facilement disponibles pour les tensioactifs d'intérêt, par exemple, le polysorbate 80 (« Tween 80 ») a une BHL de 15,0 et le trioléate de sorbitane (« Span 85 ») a une BHL de 1,8.

Lorsque deux tensioactifs ou plus sont mélangés, la BHL résultante du mélange est facilement calculée par la moyenne pondérée, par exemple, un mélange de 70/30 en % en poids de polysorbate 80 et de trioléate de sorbitane a une BHL de (15,0 x 0,70) + (1,8 x 0,30) c'est-à-dire 11,04.

Selon les premier, deuxième et troisième aspects de la présente invention, le composant tensioactif comprend au moins un tensioactif et le composant tensioactif a une valeur de BHL de 2,5 à 9,0 de préférence de 3,3 à 8,4. Par exemple, le composant tensioactif peut avoir une valeur de BHL de 3,5 à 7,7, de 4,0 à 7,5, de 4,7 à 7,1 ou de 5,1 à 6,2.

Selon les quatrième, cinquième et sixième aspects de la présente invention, le composant tensioactif comprend au moins un tensioactif et le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9,0 à 14,0, de préférence de 9,3 à 13,5. Par exemple, le composant tensioactif peut avoir une valeur de BHL de 10,1 à 11,2. Dans certains modes de réalisation, il peut même être possible de préparer une émulsion de l'invention en utilisant un composant tensioactif avec une BHL supérieure à 14,0, par exemple, en utilisant du/des polysorbate(s) seul(s). Ainsi, par exemple, une émulsion similaire au AS03 pourra être préparée en appliquant les procédés de l'invention aux composants non aqueux connus de cette émulsion (à savoir le

squalène, l'α-tocophérol, et le polysorbate 80), mais avec un rapport pondéral tensioactif/huile légèrement supérieur à celui dans le AS03. Ceci pourra être obtenu en augmentant la proportion de tensioactif (polysorbate 80) par rapport à l'huile et/ou en diminuant la proportion d'huile (squalène et/ou α-tocophérol) par rapport au tensioactif.

Lorsque le composant tensioactif comprend plus d'un tensioactif, alors au moins l'un d'entre eux aura généralement une BHL d'au moins 10 (par exemple, dans la plage de 12 à 16, ou 13 à 17) et au moins l'un d'entre eux a une BHL inférieure à 10 (par exemple, dans la plage de 1 à 9, ou 1 à 4). Par exemple, le composant tensioactif de la composition peut comprendre du polysorbate 80 et du trioléate de sorbitane. Dans des modes de réalisation de la présente invention, le composant tensioactif comprend un premier tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5, de préférence 1 à 4 et un second tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17.

Comme il est montré dans les exemples de la demande, les compositions d'huile/tensioactif comprenant un composant tensioactif ayant une valeur de BHL dans la plage de 2,5 à 9,0 tendent à former des émulsions huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm, par exemple, dans la plage de 100 à 220 nm. Les compositions d'huile/tensioactif comprenant un composant tensioactif ayant une valeur de BHL dans la plage de 9,0 à 14,0 tendent à former des émulsions ayant un diamètre moyen de particule d'huile même plus petit qui n'est pas supérieur à 40 nm, de manière davantage préférée qui n'est pas supérieur à 30 nm.

L'invention peut être utilisée avec divers tensioactifs, y compris des tensioactifs ioniques, non ioniques et zwittérioniques. Les tensioactifs non ioniques sont préférés. L'invention peut ainsi utiliser des tensioactifs y compris, mais n'y étant pas limités : des tensioactifs d'esters de

sorbitane polyoxyéthylène (couramment appelés Tween ou polysorbates), spécialement le polysorbate 20 et le polysorbate 80 ; des copolymères d'oxyde d'éthylène (EO), d'oxyde de propylène (PO), et/ou d'oxyde de butylène (BO), vendus sous le nom commercial de DOWFAX™, comme des copolymères séquencés linéaires de EO/PO ; des octoxynols, qui peuvent varier dans le nombre de groupes répétitifs éthoxy (oxy-1,2-éthanediyle), avec l'octoxynol-9 (Triton X-100, ou t-octylphénoxypolyéthoxyéthanol) étant d'un intérêt particulier ; l'(octylphénoxy)polyéthoxyéthanol (IGEPAL CA-630/NP-40) ; des phospholipides comme la phosphatidyl-choline (lécithine) ; des éthers gras de polyoxyéthylène dérivés des alcools laurylique, cétylique, stéarylique et oléylique (connus comme les tensioactifs Brij), comme l'éther monolaurylique de triéthylène glycol (Brij 30) ; l'éther de polyoxyéthylène-9-lauryle ; et des esters de sorbitane (couramment connus comme les Span), comme le trioléate de sorbitane (Span 85) et le monolaurate de sorbitane. De nombreux exemples de tensioactifs pharmaceutiquement acceptables sont connus de l'état de l'art pour une utilisation dans la composition et ainsi dans l'émulsion finale.

Dans un mode de réalisation particulier, les tensioactifs à inclure dans la composition sont le polysorbate 80 (monooléate de sorbitane polyoxyéthylène) et le trioléate de sorbitane. Si la composition comprend un seul tensioactif, alors celui-ci est un tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17, de préférence le polysorbate 80 (valeur de BHL de 15). Si la composition comprend deux tensioactifs, un mélange de polysorbate 80 et de trioléate de sorbitane est préférée. En termes généraux, les compositions comprenant de 20 à 80 % (en volume) de trioléate de sorbitane présentent une bonne capacité à former une émulsion, tandis que les compositions

avec seulement 10 % (en volume) de trioléate de sorbitane se comportent moins bien. De façon similaire, les compositions comprenant de 20 à 80 % (en volume) de polysorbate 80 présentent une bonne capacité à former une émulsion, tandis que les compositions avec seulement 10 % (en volume) de polysorbate 80 en général se sont moins bien comportées, bien que leur comportement puisse être amélioré en assurant un volume en excès d'au moins 4 fois de trioléate de sorbitane.

Un autre mélange de tensioactifs utile (comme il est observé dans « AF03 ») est constitué d'oléate de sorbitane et d'éther cétostéarylique de polyoxyéthylène. Le monooléate de sorbitane a une BHL de 4,3 tandis que l'éther cétostéarylique de polyoxyéthylène a une BHL de 13,5.

Au sein de la composition, la quantité totale de tensioactif constitue idéalement au moins 50 % (en volume). Comme il est montré dans les exemples, une teneur inférieure en tensioactif ne tend pas à favoriser l'émulsification spontanée. Dans un mode de réalisation particulier, les quantités de tensioactif dans la composition sont entre 50 et 90 %. Dans un autre mode de réalisation, les quantités de tensioactif dans la composition sont entre 60 et 90 %. Une teneur en tensioactif dans la composition d'environ 60 %, 70 %, 80 % ou 90 % (en volume) est particulièrement utile.

Lorsqu'une composition d'huile/tensioactif comprend un tensioactif ayant une BHL supérieure à 8, alors la concentration de ce tensioactif est de préférence au moins 4000 x supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC), par exemple, au moins 5000 x supérieure, 6000 x supérieure, 8000 x supérieure, 10000 x supérieure, 12000 x supérieure, 15000 x supérieure, ou même au moins 20000 x supérieure à la CMC.

Le rapport de la quantité totale de tensioactif sur la quantité totale d'huile est idéalement d'au moins 1/1. Dans un

mode de réalisation particulier, le tensioactif est présent dans un volume en excès par rapport à l'huile. Comme il est montré dans les exemples, une teneur d'huile en excès ne tend pas à favoriser l'émulsification spontanée. Dans un mode de réalisation particulier, un rapport en volume de tensioactif/ huile est de 1/1 à 10/1.

Mélanges d'huile/tensioactif contenant du squalène

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, l'huile pour une utilisation dont fait l'invention est le squalène (qui sera habituellement utilisé comme le seul composant huileux, mais qui peut être utilisé éventuellement en combinaison avec une autre huile comme un α-tocophérol). En combinaison avec un composant tensioactif comprenant ou constitué de polysorbate 80 (comme un mélange de polysorbate 80 et de trioléate de sorbitane), le squalène donne des compositions utiles.

Le composant tensioactif dans ces compositions peut avoir une valeur de BHL de 10 à 18 (par exemple, de 13 à 17, ou dans des modes de réalisation particuliers de 14 à 16), ou un tensioactif de BHL élevée peut être mélangé avec un tensioactif de BHL inférieure pour fournir un composant tensioactif avec une valeur de BHL de 6 à 11 ou de 2,5 à 9,0 (par exemple, de 3,3 à 8,4). Le composant tensioactif peut comprendre un premier tensioactif ayant une valeur de BHL inférieure à 10 et un second tensioactif ayant une valeur de BHL d'au moins 10. Par exemple, il peut comprendre un premier tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 4 (par exemple, le trioléate de sorbitane) et un second tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 (par exemple, le polysorbate 80).

Idéalement, ces compositions d'huile/tensioactif ont un volume en excès de squalène par rapport au composant tensioactif. Ainsi, par exemple, elles peuvent comprendre (en

volume) : 60 à 80 % de squalène, avec le reste étant soit du polysorbate 80 soit un mélange de polysorbate 80 et de trioléate de sorbitane. Par exemple, la quantité de squalène peut être de 65 à 75 %, 68 à 72 % de squalène, 69 à 71 % de squalène, ou 70 % de squalène en volume.

Idéalement, ces compositions sont constituées essentiellement de seulement ces deux ou trois composants, c'est-à-dire, le squalène, le polysorbate 80 et, éventuellement, le trioléate de sorbitane. Par exemple, ≥ 95 % en volume de la composition est constituée (a) de squalène et de polysorbate 80 ou (b) de squalène, de polysorbate 80, et de trioléate de sorbitane. Une composition constituée de squalène et de polysorbate 80 peut être utilisée, idéalement avec un volume en excès de squalène.

Le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 dans ces compositions peut être de 70 à 90 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif. Lorsque la composition comprend du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80, le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 peut être de 70 à 90 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif.

En termes plus généraux, le % en volume combiné de l'huile et d'un tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 peut être de 70 à 90 % du volume total d'huile, de tensioactif ayant une valeur de BHL de 1 à 5 et de tensioactif ayant une valeur de BHL de 13 à 17 dans la composition d'huile/ tensioactif.

A la place du polysorbate 80, la composition peut utiliser un autre tensioactif non ionique ayant une BHL située dans la plage de 14 à 16, mais le polysorbate 80 est préféré.

La phase aqueuse

Selon l'invention, les procédés de préparation des émulsions font usage d'une phase aqueuse. Cette phase aqueuse peut être de l'eau claire (par exemple, l'eau pour injectables) ou elle peut comprendre d'autres composants, par exemple, des solutés. Par exemple, dans des modes de réalisation particuliers, elle comprend de préférence des sels, qui peuvent être utilisés pour influencer la tonicité et/ou pour contrôler le pH. Par exemple, les sels peuvent former un tampon de pH, par exemple, des sels citrate ou phosphate, comme des sels de sodium. Les tampons types comprennent : un tampon phosphate ; un tampon Tris ; un tampon borate ; un tampon succinate ; un tampon histidine ; ou un tampon citrate. Dans des modes de réalisation préférés, la phase aqueuse est dépourvue de tampons. Dans d'autres modes de réalisation de l'invention, une phase aqueuse tamponnée est préférée, et les tampons seront généralement inclus dans la plage de 1 à 20 mM.

La phase aqueuse peut être tamponnée de façon appropriée. Tout tampon physiologiquement acceptable peut être utilisé dans la présente, comme l'eau, des tampons citrate, des tampons phosphate, des tampons acétate, des tampons Tris, des tampons bicarbonate, des tampons carbonate, un tampon succinate, ou analogues. Le pH de la phase aqueuse se situera de préférence entre 6,0 et 8,0, de préférence environ 6,2 à environ 6,8. Dans un exemple de mode de réalisation, le tampon est du tampon citrate 10 mM avec un pH à 6,5. La phase aqueuse peut comprendre des agents de Pickering comme le mannitol pour réduire la tension superficielle.

La phase aqueuse peut comprendre des solutés pour influencer la tonicité et/ou l'osmolalité. La tonicité peut être choisie pour être isotonique avec les tissus humains. Pour contrôler la tonicité, l'émulsion peut comprendre un sel physiologique, comme un sel de sodium. Le chlorure de sodium

(NaCl), par exemple, peut être utilisé à environ 0,9 % (p/v) (sérum physiologique). D'autres sels qui peuvent être présents comprennent le chlorure de potassium, le dihydrogénophosphate de potassium, le phosphate disodique, le chlorure de magnésium, le chlorure de calcium, etc. Des agents de tonicité non ioniques peuvent être également utilisés pour contrôler la tonicité. Des monosaccharides classés en aldoses comme le glucose, le mannose, l'arabinose, et le ribose, ainsi que ceux classés en cétoses comme le fructose, le sorbose, et le xylulose peuvent être utilisés comme des agents de tonicité non ioniques dans la présente invention. Des disaccharides comme le saccharose, le maltose, le tréhalose, et le lactose peuvent être également utilisés. En outre, des alditols (alcools polyhydroxylés acycliques, également appelés alcools de sucre) comme le glycérol, le mannitol, le xylitol, et le sorbitol sont des agents de tonicité non ioniques utiles dans la présente invention. Des agents modifiant la tonicité non ioniques peuvent être présents à une concentration d'environ 0,1 % à environ 10 % ou environ 1 % à environ 10 %, de la phase aqueuse selon l'agent qui est utilisé.

La phase aqueuse a idéalement un pH entre 5,5 et 8,5, par exemple, entre 6,0 et 8,0, ou entre 6,5 et 7,5. Cette plage de pH maintient la compatibilité avec des conditions physiologiques normales et, dans certains cas, peut être requise afin d'assurer la stabilité de certains composants de l'émulsion.

Dans des modes de réalisation particuliers, la phase aqueuse est substantiellement dépourvue d'huile(s). Ainsi, lors du mélange avec la composition d'huile/tensioactif pour former une émulsion, substantiellement la totalité de l'huile dans l'émulsion devra provenir de la composition. Dans un autre mode de réalisation, la phase aqueuse est substantiellement dépourvue de tensioactif(s). Ainsi, lors du

mélange avec la composition d'huile/tensioactif pour former une émulsion, substantiellement la totalité du tensioactif dans l'émulsion devra provenir de la composition. Dans un autre mode de réalisation, la phase aqueuse est substantiellement dépourvue à la fois d'huile(s) et de tensioactif(s).

Dans des modes de réalisation de l'invention, la phase aqueuse peut comprendre un composant antigène.

Mélange

A la différence du MF59 et du AS03, les émulsions de l'invention peuvent être préparées sans nécessiter l'utilisation d'homogénéiseurs ou de microfluidiseurs. A la différence du AF03, les émulsions de l'invention peuvent être préparées sans nécessiter de chauffage jusqu'à > 50 °C. A la place, le mélange de la composition d'huile/tensioactif avec la phase aqueuse peut mener à la formation spontanée d'une émulsion submicronique même avec seulement une légère agitation/mélange (par exemple, une simple inversion manuelle).

La présente invention propose un procédé de formation d'une émulsion huile dans l'eau selon l'invention, ledit procédé comprenant :

la fourniture d'une composition d'huile/tensioactif selon l'invention ;

la fourniture d'une phase aqueuse ;

la combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée ; et

le mélange léger de la composition diluée pour former une émulsion huile dans l'eau.

L'étape de formation d'une composition diluée peut prendre place par un simple mélange de la composition

d'huile/tensioactif avec la phase aqueuse. De préférence, la formation d'une composition diluée est obtenue en ajoutant la composition d'huile/tensioactif dans la phase aqueuse. L'étape de combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée peut comprendre parfois deux étapes distinctes : (i) le mélange de volumes égaux de la composition d'huile/tensioactif et de la phase aqueuse ; et (ii) la dilution du mélange de la composition d'huile/tensioactif et de la phase aqueuse avec un autre volume de phase aqueuse pour former une composition diluée. Dans un mode de réalisation particulier, les étapes (i) et (ii) sont obtenues chacune par addition de l'huile/tensioactif dans la phase aqueuse.

Le mélange peut être réalisé sans nécessiter de pression de cisaillement quelconque, sans utiliser un mélange par rotor/stator, à des pressions normales, et sans composants circulant à travers une pompe. Le procédé peut être réalisé en l'absence d'agitation mécanique.

Le mélange de la composition et de la phase aqueuse peut être agité/mélangé légèrement afin de former une émulsion huile dans l'eau. Le mélange léger est fourni par des moyens autres qu'une homogénéisation, une microfiltration, une microfluidisation, une sonication (ou d'autres procédés à cisaillement élevé ou énergie élevée) ou un procédé à température d'inversion de phase dans lequel la température de l'émulsion est augmentée jusqu'à ce que l'émulsion s'inverse. De façon appropriée, l'agitation légère peut comprendre l'inversion du mélange à la main, ou elle peut comprendre une agitation, ou elle peut comprendre le mélange par passage à travers une seringue, ou elle peut comprendre tout procédé similaire. Globalement, le mélange est obtenu en appliquant une force de dispersion minimale contrôlée.

L'étape de combinaison de la composition d'huile/tensioactif et de la phase aqueuse d'un procédé de l'invention peut prendre place au-dessous de 55 °C, par exemple, n'importe où dans la plage de 5 à 50 °C, par exemple entre 10 et 20 °C, entre 20 et 30 °C, entre 30 et 50 °C, ou entre 40 et 50 °C. Le procédé peut prendre place de façon utile à température ambiante, c'est-à-dire environ 20 à 25 °C. La composition et/ou la phase aqueuse sont de préférence équilibrées à la température souhaitée avant d'être mélangées. Par exemple, les deux composants pourront être équilibrés à 40 °C et ensuite mélangés. Après le mélange, le mélange peut être maintenu à une température au-dessous de 55 °C alors que l'émulsion se forme. Dans un mode de réalisation particulier, la composition d'huile/tensioactif et/ou la phase aqueuse sont chauffées avant le mélange et maintenues à la température souhaitée (au-dessous de 55 °C) jusqu'à ce que le mélange des deux composants soit complet et ensuite la température est réduite.

La composition d'huile/tensioactif est idéalement mélangée avec un volume en excès de la phase aqueuse, pour s'assurer qu'une émulsion huile dans l'eau se forme (plutôt qu'une émulsion eau dans l'huile). Dans un mode de réalisation particulier, la phase aqueuse est substantiellement dépourvue de tensioactif(s) et/ou d'huile(s). Le procédé utilise de préférence la phase aqueuse dans un volume en excès d'au moins 5 fois, par exemple, entre 5 fois et 50 fois de volume supérieur. Dans un mode de réalisation particulier, le rapport de la phase aqueuse sur la composition d'huile/tensioactif est de 10/1 à 50/1 (en volume). Dans un autre mode de réalisation, le rapport de la phase aqueuse sur la composition d'huile/tensioactif est de 20/1 à 40/1 (en volume).

Le procédé de l'invention peut être utilisé à une échelle de laboratoire ou de paillasse ou à une échelle industrielle. Ainsi, la composition et/ou la phase aqueuse peuvent avoir un

volume situé dans la plage de 10 à 100 ml, dans la plage de 100 à 1000 ml, dans la plage de 1 à 10 l, ou même dans la plage de 10 à 100 l.

Les procédés de l'invention peuvent comprendre en outre l'étape de soumission de l'émulsion huile dans l'eau à une stérilisation par filtration. La stérilisation par filtration peut prendre place à n'importe quel stade approprié, par exemple, lors du placement de l'émulsion dans des récipients (le stade de remplissage), ou avant le séchage (qui peut être réalisée de façon aseptique, pour maintenir une émulsion stérile durant et après le séchage).

En général, un procédé de l'invention peut impliquer les étapes suivantes : la préparation d'une émulsion, sans l'utilisation de microfluidisation ; sa stérilisation par filtration ; et le conditionnement de l'émulsion stérilisée, éventuellement après sa combinaison avec un immunogène. L'émulsion possède une activité d'adjuvant, et le matériau conditionné est approprié pour une injection, pour déclencher une réponse immunitaire.

L'émulsion huile dans l'eau

Dans un deuxième aspect, la présente invention propose une émulsion huile dans l'eau comprenant :

une composition d'huile/tensioactif pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm, ladite composition comprenant

au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 2,5 à 9,0, et où la composition d'huile/tensioactif est

substantiellement dépourvue de composants aqueux ; en combinaison avec une phase aqueuse ;

où ladite émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm.

Lorsqu'une émulsion est décrite comme ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm, cette moyenne est idéalement située au sein de la plage de 100 à 220 nm, par exemple entre 120 et 200 nm ou 150 à 200 nm.

Dans un cinquième aspect, la présente invention propose une émulsion huile dans l'eau comprenant :

une composition d'huile/tensioactif pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm, ladite composition comprenant

au moins une huile biocompatible, métabolisable ; et

un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9,0 à 14,0, et où la composition d'huile/tensioactif est substantiellement dépourvue de composants aqueux ; en combinaison avec une phase aqueuse ;

où ladite émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm.

Dans un mode de réalisation particulier, le diamètre moyen de particule d'huile des émulsions huile dans l'eau selon le cinquième aspect de la présente invention n'est pas supérieur à 30 nm, de manière davantage préférée pas supérieur à 20 nm.

Le diamètre moyen des particules d'huile dans une émulsion peut être déterminé de diverses manières, par exemple, en utilisant les techniques de diffusion dynamique de la lumière et/ou de détection optique de particules simples,

en utilisant un appareil tel que des séries d'instruments Accusizer™ et Nicomp™ disponibles chez Particle Sizing Systems (Santa Barbara, Etats-Unis), les instruments Zetasizer™ de Malvern Instruments (Royaume-Uni), ou les instruments Particle Size Distribution Analyzer de Horiba (Kyoto, Japon). Voir également la référence 12. Dans un mode de réalisation particulier, la diffusion dynamique de la lumière (DLS) est le procédé par lequel les diamètres des particules d'huile sont déterminés. Dans un mode de réalisation particulier, le procédé pour définir le diamètre moyen de particule d'huile est une moyenne Z, c'est-à-dire la taille hydrodynamique moyenne pondérée par l'intensité de la collection dans son ensemble de gouttelettes mesurée par DLS. La moyenne Z est dérivée de l'analyse des cumulants de la courbe de corrélation mesurée, où la taille d'une seule particule (diamètre de gouttelette) est supposée et un ajustement exponentiel simple est appliqué à la fonction d'autocorrélation. Ainsi, les références dans la présente à un diamètre moyen devront être prises comme une moyenne pondérée par l'intensité, et idéalement la moyenne Z.

Dans un mode de réalisation particulier, les gouttelettes au sein des émulsions de l'invention présentent un indice de polydispersité inférieur à 0,4. La polydispersité est une mesure de la largeur de la distribution des tailles des particules, et elle est traditionnellement exprimée en indice de polydispersité (IPd). Un indice de polydispersité supérieur à 0,7 indique que l'échantillon présente une distribution des tailles très large et une valeur rapportée de 0 signifie que la variation de taille est absente, bien que des valeurs inférieures à 0,05 soient rarement observées. Dans un mode de réalisation particulier, il est préférable pour les gouttelettes d'huile au sein d'une émulsion de l'invention qu'elles soient d'une taille relativement uniforme. Ainsi,

dans des modes de réalisation particuliers, les gouttelettes d'huile dans les émulsions ont un IPd inférieur à 0,35, par exemple, inférieur à 0,3, 0,275, 0,25, 0,225, 0,2, 0,175, 0,15, 0,125, ou même inférieur à 0,1. Les valeurs d'IPd sont facilement fournies par la même instrumentation qui mesure le diamètre.

Traitement en aval

Les émulsions huile dans l'eau de la présente invention peuvent être filtrées. Cette filtration élimine toutes les grosses gouttelettes d'huile de l'émulsion. Bien que peu en termes de nombre, ces gouttelettes d'huile peuvent être grosses en termes de volume et elles peuvent agir comme des sites de nucléation pour une agrégation, menant à une dégradation de l'émulsion durant le stockage. En outre, cette étape de filtration peut obtenir une stérilisation par filtration.

La membrane de filtration particulière appropriée pour une stérilisation par filtration dépend des caractéristiques de fluidité de l'émulsion huile dans l'eau et du degré de filtration requis. Les caractéristiques d'un filtre peuvent affecter son adéquation pour la filtration de l'émulsion. Par exemple, sa taille de pore et ses caractéristiques de surface peuvent être importantes, particulièrement lors de la filtration d'une émulsion à base de squalène.

La taille de pore des membranes utilisées dans le cadre de l'invention devra permettre le passage des gouttelettes souhaitées tout en retenant les gouttelettes indésirables. Par exemple, elle devra retenir les gouttelettes qui ont une taille $\geq$ 1 µm tout en permettant le passage des gouttelettes < 200 nm. Un filtre de 0,2 µm ou 0,22 µm est idéal, et peut ainsi obtenir une stérilisation par filtration.

L'émulsion peut être préfiltrée, par exemple, à travers un filtre de 0,45 µm. La préfiltration et la filtration peuvent être obtenues dans une étape par l'utilisation de filtres à double couche connus qui comprennent une première couche de membrane avec des pores plus gros et une seconde couche de membrane avec des pores plus petits. Les filtres à double couche sont particulièrement utiles dans le cadre de l'invention. La première couche a idéalement une taille de pore > 0,3 µm comme entre 0,3 et 2 µm ou entre 0,3 et 1 µm, ou entre 0,4 et 0,8 µm, ou entre 0,5 et 0,7 µm. Une taille de pore ≤ 0,75 µm dans la première couche est préférée. Ainsi, la première couche peut avoir une taille de pore de 0,6 µm ou 0,45 µm, par exemple. La seconde couche a idéalement une taille de pore qui est inférieure à 75 % de (et idéalement inférieure à la moitié de) la taille de pore de la première couche, comme entre 25 et 70 % ou entre 25 et 49 % de la taille de pore de la première couche, par exemple, entre 30 et 45 %, comme 1/3 ou 4/9, de la taille de pore de la première couche. Ainsi, la seconde couche peut avoir une taille de pore < 0,3 µm, comme entre 0,15 et 0,28 µm ou entre 0,18 et 0,24 µm, par exemple, une seconde couche de taille de pore de 0,2 µm ou 0,22 µm. Dans un exemple, la première couche de membrane avec des pores plus gros fournit un filtre de 0,45 µm, alors que la seconde couche de membrane avec des pores plus petits fournit un filtre de 0,22 µm.

La membrane de filtration et/ou la membrane de préfiltration peuvent être asymétriques. Une membrane asymétrique est une membrane dans laquelle la taille de pore varie d'un côté de la membrane à l'autre, par exemple, dans laquelle la taille de pore est plus grosse sur la face de l'entrée par rapport à la face de la sortie. Un côté de la membrane asymétrique peut être qualifié de « surface à pores

grossiers », alors que l'autre côté de la membrane asymétrique peut être qualifié de « surface à pores fins ». Dans un filtre à double couche, l'une ou (idéalement) les deux couches peuvent être asymétriques.

La membrane de filtration peut être poreuse ou homogène. Une membrane homogène est habituellement un film dense situé dans la plage de 10 à 200 µm. Une membrane poreuse a une structure poreuse. Dans un mode de réalisation, la membrane de filtration est poreuse. Dans un filtre à double couche, les deux couches peuvent être poreuses, les deux couches peuvent être homogènes, ou il peut y avoir une couche poreuse et une couche homogène. Un filtre à double couche préféré est un filtre dans lequel les deux couches sont poreuses.

Dans un mode de réalisation, les émulsions huile dans l'eau de l'invention sont préfiltrées à travers une membrane poreuse hydrophile asymétrique et ensuite filtrées à travers une autre membrane poreuse hydrophile asymétrique ayant des pores plus petits que la membrane de préfiltration. On peut utiliser un filtre à double couche.

La/les membrane(s) des filtres peuvent être autoclavées avant utilisation pour s'assurer ainsi de la stérilité.

Les membranes de filtration sont généralement faites de matériaux de support polymères comme le PTFE (poly-tétra-fluoro-éthylène), la PES (polyéthersulfone), la PVP (polyvinyl-pyrrolidone), le PVDF (polyfluorure de vinylidène), les nylons (polyamides), le PP (polypropylène), les celluloses (y compris les esters cellulosiques), la PEEK (polyéther-éthercétone), la nitrocellulose, etc. Ceux-ci ont des caractéristiques variables, avec certains supports étant intrinsèquement hydrophobes (par exemple, le PTFE) et d'autres étant intrinsèquement hydrophiles (par exemple, les acétates de cellulose). Toutefois, ces caractéristiques intrinsèques peuvent être modifiées en traitant la surface de la membrane.

Par exemple, on sait préparer des membranes hydrophilisées ou hydrophobisées en les traitant avec d'autres matériaux (comme d'autres polymères, du graphite, de la silicone, etc.) pour revêtir la surface de la membrane, par exemple, voir la section 2.1 de la référence 13. Dans un filtre à double couche, les deux membranes peuvent être faites de matériaux différents ou (idéalement) du même matériau.

Les détails des techniques de filtration appropriées sont disponibles, par exemple, dans la référence 14.

Durant la filtration, l'émulsion peut être maintenue à une température de 40 °C ou inférieure, par exemple, 30 °C ou inférieure, pour faciliter une stérilisation par filtration réussie. Certaines émulsions peuvent ne pas passer à travers un filtre stérile lorsqu'elles sont à une température supérieure à 40 °C.

Il est avantageux de réaliser l'étape de filtration dans les 24 heures, par exemple dans les 18 heures, dans les 12 heures, dans les 6 heures, dans les 2 heures, dans les 30 minutes, qui suivent la production de l'émulsion parce qu'après ce temps, il peut ne pas être possible de passer la seconde émulsion à travers le filtre stérile sans boucher le filtre, comme il est discuté dans la référence 15.

Les procédés de l'invention peuvent être utilisés à grande échelle. Ainsi, un procédé peut impliquer la filtration d'un volume supérieur à 1 litre, par exemple, ≥ 5 litres, ≥ 10 litres, ≥ 20 litres, ≥ 50 litres, ≥ 100 litres, ≥ 250 litres, etc.

Dans certains modes de réalisation, une émulsion qui est préparée selon l'invention peut être soumise à une microfluidisation. Ainsi, par exemple, l'invention peut être utilisée avant la microfluidisation pour réduire le degré de microfluidisation qui est requis pour donner un résultat souhaité. Ainsi, si c'est souhaité, une microfluidisation peut

être utilisée mais les forces de cisaillement globales conférées à l'émulsion peuvent être réduites.

Antigènes

Bien qu'il soit possible d'administrer uniquement des adjuvants dans l'émulsion huile dans l'eau aux patients (par exemple, pour fournir un effet adjuvant pour un antigène qui a été administré séparément au patient), il est plus habituel de mélanger l'adjuvant avec un antigène avant l'administration, pour former une composition immunogène, par exemple, un vaccin. Le mélange de l'émulsion et de l'antigène peut prendre place extemporanément, au moment de l'utilisation, ou il peut prendre place durant la fabrication du vaccin, avant le remplissage. Les émulsions de l'invention peuvent être utilisées dans une situation ou dans l'autre.

Divers antigènes peuvent être utilisés avec des émulsions huile dans l'eau, y compris, mais n'y étant pas limités : des antigènes viraux, comme des protéines de la surface virale ; des antigènes bactériens, comme des antigènes protéiniques et/ou saccharidiques ; des antigènes fongiques ; des antigènes de parasites ; et des antigènes tumoraux. L'invention est particulièrement utile pour des vaccins contre le virus de la grippe, le VIH, les ankylostomes, le virus de l'hépatite B, le virus Herpes simplex (et d'autres herpesviridae), la rage, le virus respiratoire syncytial, le cytomégalovirus, Staphylococcus aureus, les Chlamydiae, le coronavirus SARS, le virus de la varicelle-zona, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Mycobacterium tuberculosis, Bacillus anthracis, le virus d'Epstein Barr, le papillomavirus humain, le paludisme, etc. Par exemple :

Antigènes du virus de la grippe. Ceux-ci peuvent prendre la forme d'un virus vivant ou d'un virus inactivé. Lorsqu'un virus inactivé est utilisé, le vaccin peut comprendre le

virion entier, le virion fragmenté, ou des antigènes de surface purifiés (y compris l'hémagglutinine et, habituellement, également y compris la neuraminidase). Les antigènes de la grippe peuvent également se présenter sous la forme de virosomes. Les antigènes peuvent avoir tout sous-type d'hémagglutinine, choisi parmi H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 et/ou H16. Le vaccin peut comprendre un ou plusieurs antigènes d'une ou de plusieurs (par exemple, 1, 2, 3, 4 ou plus) souches de virus de la grippe, y compris le virus de la grippe A et/ou le virus de la grippe B, par exemple, un vaccin A/H5N1 ou A/H1N1 monovalent, ou un vaccin A/H1N1 + A/H3N2 + B trivalent. Les vaccins peuvent être pour une utilisation saisonnière ou pandémique. Le virus de la grippe peut être une souche réassortie, et il peut avoir été obtenu par des techniques de génétique inverse [par exemple, 16-20]. Ainsi le virus peut comprendre un ou plusieurs segments d'ARN d'un virus A/PR/8/34 (généralement 6 segments de A/PR/8/34, avec les segments HA et N étant d'une souche vaccinale, c'est-à-dire, une souche réassortie 6/2). Les virus utilisés comme source des antigènes peuvent être développés soit sur des œufs (par exemple, des œufs de poules embryonnés) soit sur culture cellulaire. Lorsqu'une culture cellulaire est utilisée, le substrat cellulaire sera généralement une lignée cellulaire de mammifère, comme MDCK ; CHO ; 293T ; BHK ; Vero ; MRC-5 ; PER.C6 ; WI-38 ; etc. Les lignées cellulaires de mammifères préférées pour développer les virus de la grippe comprennent : des cellules MDCK [21-24], dérivées du rein de chien Madin Darby ; des cellules Vero [25-27], dérivées du rein du singe vert d'Afrique ; ou des cellules PER.C6 [28], dérivées des rétinoblastes embryonnaires humains. Lorsque le virus a été développé sur une lignée cellulaire de mammifère, alors la composition sera de façon avantageuse dépourvue de protéine d'œuf (par exemple,

ovalbumine et ovomucoïde) et d'ADN de poulet, réduisant de cette façon l'allergénicité. Les doses unitaires de vaccin sont généralement standardisées en référence à la teneur en hémagglutinine (HA), mesurée généralement par SRID. Les vaccins existants contiennent généralement environ 15 µg de HA par souche, bien que des doses inférieures puissent être utilisées, particulièrement lorsqu'il est utilisé un adjuvant. Des doses fractionnées comme 1/2 (c'est-à-dire, 7,5 µg de HA par souche), 1/4 et 1/8 ont été utilisées [29,30], comme l'ont été des doses supérieures (par exemple, des doses de 3x ou 9x [31,32]). Ainsi, les vaccins peuvent comprendre entre 0,1 et 150 µg de HA par souche grippale, de préférence entre 0,1 et 50 µg, par exemple, 0,1 à 20 µg, 0,1 à 15 µg, 0,1 à 10 µg, 0,1 à 7,5 µg, 0,5 à 5 µg, etc. Les doses particulières comprennent, par exemple, environ 15, environ 10, environ 7,5, environ 5, environ 3,8, environ 3,75, environ 1,9, environ 1,5, etc. par souche.

Virus de l'immunodéficience humaine, y compris VIH-1 et VIH-2. L'antigène sera généralement un antigène de l'enveloppe.

Antigènes de surface du virus de l'hépatite B. Cet antigène est de préférence obtenu par des procédés d'ADN recombinant, par exemple, après expression dans une levure Saccharomyces cerevisiae. A la différence de l'Ag HBs natif, l'antigène recombinant exprimé par une levure est non glycosylé. Il peut être sous la forme de particules substantiellement sphériques (diamètre moyen d'environ 20 nm), incluant une matrice lipidique comprenant des phospholipides. A la différence des particules d'Ag HBs natif, les particules exprimées par une levure peuvent comprendre du phosphatidyl-inositol. L'Ag HBs peut être de l'un quelconque des sous-types ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- et adrq+.

L'ankylostome, particulièrement tel qu'observé chez les chiens (Ancylostoma caninum). Cet antigène peut être l'Ac-MTP-1 (métalloprotéase de type astacine) recombinante et/ou une hémoglobinase aspartique (Ac-APR-1), qui peut être exprimée dans un système de baculovirus/cellule d'insecte sous la forme d'une protéine sécrétée [33,34].

Antigène du virus Herpes simplex (HSV). Un antigène du HSV préféré pour une utilisation dont fait l'invention est la glycoprotéine membranaire gD. Il est préférable d'utiliser la gD provenant d'une souche de HSV-2 (antigène 'gD2'). La composition peut utiliser une forme de gD dans laquelle la région d'ancrage membranaire C-terminale a été délétée [35], par exemple, une gD tronquée comprenant les acides aminés 1 à 306 de la protéine naturelle avec l'addition d'asparagine et de glutamine à l'extrémité C-terminale. Cette forme de la protéine comprend le peptide signal qui est clivé pour produire une protéine mature de 283 acides aminés. La délétion de la région d'ancrage permet de préparer la protéine sous forme soluble. L'invention peut être également utilisée avec d'autres herpesviridae, comme le virus de la varicelle-zona (VZV), le virus d'Epstein-Barr (EBV), ou le cytomégalovirus humain (hCMV). Une composition anti-hCMV peut comprendre un antigène de glycoprotéine B (gB) dans certains modes de réalisation, ou elle peut comprendre un ou plusieurs des antigènes gH, gL et gO.

Antigènes de papillomavirus humain (HPV). Les antigènes de HPV préférés pour une utilisation dont fait l'invention sont les protéines de la capside L1, qui peuvent s'assembler pour former des structures connues sous le nom de particules pseudovirales (PPV). Les PPV peuvent être produites par expression recombinante de L1 dans des cellules de levures (par exemple, dans S. cerevisiae) ou dans des cellules d'insectes (par exemple, dans des cellules de Spodoptera,

comme S. frugiperda, ou dans des cellules de Drosophila). Pour les cellules de levures, des vecteurs plasmidiques peuvent porter le(s) gène(s) L1 ; pour les cellules d'insectes, des vecteurs baculoviraux peuvent porter le(s) gène(s) L1. De manière davantage préférée, la composition comprend des PPV de L1 provenant de souches à la fois de HPV-16 et de HPV-18. Il a été montré que cette combinaison bivalente est hautement efficace [36]. En plus des souches de HPV-16 et de HPV-18, il est également possible d'inclure des PPV de L1 des souches de HPV-6 et de HPV-11. L'utilisation de souches oncogènes de HPV est également possible. Un vaccin peut comprendre entre 20 et 60 µg/ml (par exemple, environ 40 µg/ml) de L1 par souche de HPV.

Antigènes de l'anthrax. L'anthrax est provoqué par Bacillus anthracis. Les antigènes appropriés de B. anthracis comprennent des composants A (facteur létal (LF) et facteur d'œdème (EF)), les deux pouvant partager un composant B commun connu sous le nom d'antigène protecteur (PA). Les antigènes peuvent être éventuellement détoxifiés. D'autres détails peuvent être trouvés dans les références [37 à 39].

Antigènes du paludisme. Une composition pour protéger contre le paludisme peut comprendre une partie de la protéine circumsporozoïte de P. falciparum issue du stade pré-érythrocytaire de l'organisme. La partie C-terminale de cet antigène peut être exprimée sous la forme d'une protéine de fusion avec l'Ag HBs, et cette protéine de fusion peut être coexprimée avec l'Ag HBs dans une levure de telle façon que les deux protéines s'assemblent pour former une particule.

Rage. Les compositions pour protéger contre la rage comprendront généralement un virion de virus de la rage inactivé, comme il est observé dans des produits comme RABIPUR, RABIVAC, et VERORAB.

Antigènes de S. aureus. Divers antigènes de S. aureus sont connus. Les antigènes appropriés comprennent des saccharides capsulaires (par exemple d'une souche de type 5 et/ou de type 8) et des protéines (par exemple, IsdB, Hla, etc.). Les antigènes saccharidiques capsulaires sont idéalement conjugués à une protéine de support.

Antigènes de S. pneumoniae. Divers antigènes de S. pneumoniae sont connus. Les antigènes appropriés comprennent des saccharides capsulaires (par exemple d'un ou de plusieurs des sérotypes 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, et/ou 23F) et des protéines (par exemple, pneumolysine, pneumolysine détoxifiée, PhtD (polyhistidine triad protein D), etc.). Les antigènes saccharidiques capsulaires sont idéalement conjugués à une protéine de support.

Antigènes méningococciques. Neisseria meningitidis est une cause de méningite bactérienne. Les antigènes méningococciques appropriés comprennent des saccharides capsulaires conjugués (particulièrement pour les sérogroupes A, C, W135, X et/ou Y), des protéines recombinantes (par exemple, la protéine de liaison du facteur H) et/ou des vésicules de la membrane externe.

Antigènes cancéreux. Divers antigènes spécifiques de tumeurs sont connus. L'invention peut être utilisée avec des antigènes qui déclenchent une réponse immunitaire thérapeutique contre le cancer du poumon, le mélanome, le cancer du sein, le cancer de la prostate, etc.

Une solution de l'antigène sera normalement mélangée avec l'émulsion, par exemple, dans un rapport de volume 1/1. Ce mélange peut être soit effectué par un fabricant de vaccin, avant le remplissage, soit il peut être effectué au moment de l'utilisation, par un professionnel de la santé. Toutefois, comme il est noté ci-dessous, une variante de formulation

comprend à la fois l'antigène et l'émulsion sous forme séchée dans un seul récipient à reconstituer.

Utilisations des émulsions huile dans l'eau de l'invention

Selon un aspect de la présente invention, les émulsions huile dans l'eau de la présente invention sont pour une utilisation en tant qu'adjuvant, de préférence un adjuvant de vaccin. De façon appropriée, ledit adjuvant est administré comme partie d'un vaccin.

Dans un autre aspect, la présente invention propose une composition immunogène (par exemple, un vaccin) comprenant une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention, et un composant antigène. L'invention propose en outre un procédé de préparation de telles compositions immunogènes, ledit procédé comprenant le mélange d'une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention, avec un composant antigène.

La présente invention propose également un kit comprenant :

une composition d'huile/tensioactif selon la présente invention ;

une phase aqueuse ; et éventuellement

des instructions pour combiner la composition d'huile/tensioactif et la phase aqueuse.

Selon des modes de réalisation de l'invention, la composition d'huile/tensioactif et/ou la phase aqueuse peuvent comprendre un composant antigène.

Dans un autre aspect, la présente invention propose un procédé de préparation d'un kit comprenant les étapes suivantes :

la fourniture d'une composition d'huile/tensioactif selon la présente invention ; et

le conditionnement de la composition dans un kit en tant que composant de kit conjointement avec une phase aqueuse ; et éventuellement

le conditionnement d'un composant antigène dans le kit en tant que composant de kit conjointement avec la composition d'huile/tensioactif et la phase aqueuse.

La présente invention propose également un kit comprenant :

une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention ; et

un composant antigène.

La présente invention propose en outre un procédé de préparation d'un kit comprenant les étapes suivantes :

la fourniture d'une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention ; et

le conditionnement de l'émulsion dans un kit en tant que composant de kit conjointement avec un composant antigène séparé.

Bien qu'il soit possible d'administrer uniquement des adjuvants en émulsion huile dans l'eau aux patients (par exemple, pour fournir un effet adjuvant pour un antigène qui a été administré séparément au patient), il est plus habituel de mélanger l'adjuvant avec un antigène avant l'administration, pour former une composition immunogène, par exemple, un vaccin. Le mélange de l'émulsion et de l'antigène peut prendre place extemporanément, au moment de l'utilisation, ou il peut prendre place durant la fabrication du vaccin, avant le remplissage.

Globalement, par conséquent, l'invention peut être utilisée lors de la préparation de vaccins reconstitués ou lors de la préparation de kits comprenant un antigène et un adjuvant prêts à mélanger. Lorsque le mélange prend place durant la fabrication, alors les volumes des vracs d'antigène

et d'émulsion qui sont mélangés seront généralement supérieurs à 1 litre, par exemple, ≥ 5 litres, ≥ 10 litres, ≥ 20 litres, ≥ 50 litres, ≥ 100 litres, ≥ 250 litres, etc. Lorsque le mélange prend place au moment de l'utilisation, alors les volumes qui sont mélangés seront généralement plus petits que 1 millilitre, par exemple, ≤ 0,6 ml, ≤ 0,5 ml, ≤ 0,4 ml, ≤ 0,3 ml, ≤ 0,2 ml, etc. Dans les deux cas, il est habituel de mélanger des volumes substantiellement égaux de l'émulsion et de la solution d'antigène, c'est-à-dire substantiellement 1/1 (par exemple, entre 1,1/1 et 1/1,1, de préférence entre 1,05/1 est 1/1,05, et de manière davantage préférée entre 1,025/1 et 1/1,025). Toutefois, dans certains modes de réalisation, un excès d'émulsion ou un excès d'antigène peut être utilisé [40]. Lorsqu'un excès de volume d'un composant est utilisé, l'excès sera généralement d'au moins 1,5/1, par exemple, ≥ 2/1, ≥ 2,5/1, ≥ 3/1, ≥ 4/1, ≥ 5/1, etc.

Lorsque l'antigène et l'adjuvant sont présentés sous forme de composants séparés au sein d'un kit, ils sont séparés physiquement l'un de l'autre au sein du kit, et cette séparation peut être obtenue de diverses manières. Par exemple, les composants peuvent être dans des récipients séparés, comme des flacons. Les contenus de deux flacons peuvent être ensuite mélangés lorsque c'est nécessaire, par exemple, en prélevant le contenu d'un flacon et en l'ajoutant à l'autre flacon, ou en prélevant séparément les contenus des deux flacons et en les mélangeant dans un troisième récipient.

Dans un autre arrangement, l'un des composants du kit est dans une seringue et l'autre est dans un récipient comme un flacon. La seringue peut être utilisée (par exemple, avec une aiguille) pour insérer son contenu dans le flacon pour le mélange, et le mélange peut être ensuite aspiré dans la seringue. Le contenu mélangé de la seringue peut être ensuite administré à un patient, généralement par l'intermédiaire

d'une nouvelle aiguille stérile. Le versement d'un composant dans une seringue élimine le besoin d'utiliser une seringue séparée pour une administration au patient.

Dans un autre arrangement préféré, les deux composants du kit sont maintenus ensemble mais séparément dans la même seringue, par exemple, une seringue à chambre double, comme celles décrites dans les références 41 à 48, etc. Lorsque la seringue est actionnée (par exemple, durant l'administration à un patient), alors les contenus des deux chambres sont mélangés. Cet arrangement évite le besoin d'une étape de mélange séparée au moment de l'utilisation.

Les contenus des divers composants du kit seront généralement tous sous forme liquide.

Les vaccins sont généralement administrés par injection, particulièrement par injection intramusculaire. Les compositions de l'invention sont généralement présentées au moment de l'utilisation sous forme de solutions ou de suspensions aqueuses. Dans certains modes de réalisation de l'invention, les compositions sont sous forme aqueuse depuis le stade du conditionnement jusqu'au stade de l'administration. Dans d'autres modes de réalisation, toutefois, un ou plusieurs composants des compositions peuvent être conditionnés sous forme séchée (par exemple, lyophilisée), et un adjuvant pour une administration effective peut être reconstitué lorsque c'est nécessaire. L'émulsion peut être ainsi distribuée sous forme de gâteau lyophilisé. Le séchage peut être obtenu de façon pratique par lyophilisation, mais d'autres techniques peuvent être également utilisées, par exemple, le séchage par pulvérisation. Le séchage par lyophilisation est préféré.

Par conséquent, dans un aspect, la présente invention propose un matériau séché (par exemple, un lyophilisat) qui, lorsqu'il est reconstitué avec une phase aqueuse fournit une

émulsion huile dans l'eau selon la présente invention. Le matériau séché est de préférence un lyophilisat. Tel qu'utilisé dans la présente, « matériau sec » ou « matériau séché » se rapporte à un matériau qui est substantiellement dépourvu d'eau ou à un matériau qui est substantiellement dépourvu de phase aqueuse. Idéalement, une émulsion peut être reconstituée dans sa composition d'origine simplement en ajoutant de l'eau (par exemple, elle ne perd aucun composant à l'exception de l'eau durant le séchage). L'invention propose également un procédé de préparation dudit matériau séché, où ledit procédé comprend la préparation d'une émulsion huile dans l'eau selon l'invention et la soumission de l'émulsion à un procédé de séchage. De façon appropriée, l'émulsion est combinée avec un ou plusieurs stabilisants de lyophilisation. L'émulsion peut être également combinée avec au moins un composant antigène avant le séchage, éventuellement en plus d'un ou de plusieurs stabilisants de lyophilisation.

Dans certains arrangements, un composant (généralement le composant émulsion) est sous forme sèche (par exemple, sous une forme lyophilisée), avec les composants restants (généralement, l'antigène et/ou une phase aqueuse) étant sous forme liquide. Les deux composants ou plus peuvent être mélangés afin de réactiver le composant sec et donner une composition liquide pour une administration à un patient. Un composant séché sera généralement placé au sein d'un flacon plutôt que d'une seringue.

Un composant lyophilisé (par exemple, l'émulsion) peut comprendre des stabilisants de lyophilisation. Ces stabilisants comprennent des substances comme des alcools de sucre (par exemple, le mannitol, etc.) ou de simples saccharides comme des disaccharides et des trisaccharides. Les stabilisants de lyophilisation sont de préférence de petits saccharides comme des disaccharides. Ils comprennent de

préférence des monomères de saccharides choisis parmi le glucose, le fructose et le galactose, et les disaccharides contenant du glucose et les disaccharides contenant du fructose sont particulièrement préférés. Les exemples de disaccharides préférés comprennent du saccharose (contenant du glucose et du fructose), du tréhalose (contenant deux monosaccharides de glucose) et du maltulose (contenant du glucose et du fructose), de manière davantage préférée du saccharose, comme du lactose, du saccharose ou du mannitol, ainsi que leurs mélanges, par exemple, des mélanges de lactose/saccharose, des mélanges de saccharose/mannitol, etc.

Dans un mode de réalisation particulier, un arrangement possible comprend un composant émulsion séché dans un flacon et un composant antigène et/ou une phase aqueuse dans une seringue préremplie.

La présente invention propose également un arrangement comprenant une émulsion séchée de la présente invention et un composant antigène liquide séparé.

Est également fourni par la présente invention, un gâteau séché formé à partir de l'émulsion de l'invention. Le gâteau peut être fourni en combinaison avec une phase aqueuse séparée. L'arrangement peut comprendre en outre un composant antigène qui peut être sous forme liquide ou séchée.

La présente invention propose également un mélange séché où le mélange comprend l'émulsion de la présente invention en combinaison avec un composant antigène. Dans un mode de réalisation particulier, le mélange est un mélange lyophilisé.

Un avantage des émulsions huile dans l'eau de l'invention et de leurs procédés de fabrication selon l'invention est que lorsque l'émulsion huile dans l'eau est reconstituée avec une phase aqueuse à la suite du séchage de l'émulsion, l'émulsion huile dans l'eau résultante conserve ses propriétés d'origine

d'avant le séchage (par exemple, son diamètre moyen de particule d'huile).

L'invention propose également un kit pour préparer une émulsion huile dans l'eau de l'invention, où le kit comprend une émulsion huile dans l'eau de l'invention sous forme séchée et une phase aqueuse sous forme liquide. Le kit peut comprendre deux flacons (un contenant l'émulsion séchée et un contenant la phase aqueuse) ou il peut comprendre une seringue préremplie et un flacon, par exemple, avec le contenu de la seringue (la phase aqueuse) étant utilisé pour reconstituer le contenu du flacon (l'émulsion séchée) avant une administration à un sujet. Dans des modes de réalisation de l'invention, l'émulsion huile dans l'eau sous forme séchée est combinée avec un composant antigène qui est également sous forme séchée.

Si des vaccins contiennent des composants en plus de l'émulsion et de l'antigène, alors ces autres composants peuvent être inclus dans l'un des deux composants du kit selon des modes de réalisation de l'invention, ou ils peuvent faire partie d'un troisième composant du kit.

Les récipients appropriés pour les vaccins reconstitués de l'invention, ou pour des composants de kits individuels, comprennent des flacons et des seringues jetables. Ces récipients devront être stériles.

Lorsqu'une composition/un composant est placé(e) dans un flacon, le flacon est de préférence fait de verre ou de matériau plastique. Le flacon est de préférence stérilisé avant l'addition de la composition dans ce dernier. Pour éviter des problèmes avec les patients sensibles au latex, les flacons sont de préférence scellés avec un bouchon dépourvu de latex, et l'absence de latex dans tout le matériau de conditionnement est préférée. Dans un mode de réalisation, un flacon à un bouchon en caoutchouc butyle. Le flacon peut

comprendre une seule dose de vaccin/composant, ou il peut comprendre plus d'une dose (un flacon 'multidose'), par exemple, 10 doses. Dans un mode de réalisation, un flacon comprend 10 doses de 0,25 ml d'émulsion. Les flacons préférés sont faits de verre incolore.

Un flacon peut avoir un capuchon (par exemple, un luer-lock) adapté de telle façon qu'une seringue préremplie peut être insérée dans le capuchon, le contenu de la seringue peut être expulsé dans le flacon (par exemple, pour reconstituer le matériau séché à l'intérieur), et le contenu du flacon peut être à nouveau prélevé dans la seringue. Après le retrait de la seringue du flacon, une aiguille peut être ensuite fixée et la composition peut être administrée à un patient. Le capuchon est de préférence logé à l'intérieur d'un sceau ou d'un couvercle, de telle façon que le sceau ou le couvercle doit être retiré avant de pouvoir accéder au capuchon.

Lorsqu'une composition/un composant est conditionné(e) dans une seringue, la seringue n'aura normalement pas d'aiguille fixée, bien qu'une aiguille séparée puisse être fournie avec la seringue pour un assemblage et une utilisation. Les aiguilles de sécurité sont préférées. Les aiguilles 1-inch 23-gauge, 1-inch 25-gauge et 5/8-inch 25-gauge sont typiques. Les seringues peuvent être fournies avec des étiquettes décollables sur lesquelles le numéro de lot, la saison grippale et la date de péremption du contenu peuvent être imprimés, pour faciliter la tenue des dossiers. Le piston dans la seringue est doté d'un bloqueur pour empêcher que le piston soit retiré accidentellement durant l'aspiration. Les seringues peuvent avoir un capuchon et/ou un piston en latex de caoutchouc. Les seringues jetables contiennent une seule dose d'adjuvant ou de vaccin. La seringue comportera généralement un capuchon à son extrémité pour sceller l'extrémité avant la fixation d'une aiguille, et le capuchon

de l'extrémité est de préférence fait de caoutchouc butyle. Si la seringue et l'aiguille sont conditionnées séparément, alors l'aiguille est de préférence équipée d'une protection en caoutchouc butyle.

L'émulsion peut être diluée avec un tampon avant le conditionnement dans un flacon ou une seringue. Les tampons types comprennent : un tampon phosphate ; un tampon Tris ; un tampon borate ; un tampon succinate ; un tampon histidine ; ou un tampon citrate. La dilution peut réduire la concentration des composants de l'adjuvant tout en conservant leur proportion relative, par exemple, pour fournir un adjuvant à « demi-concentration ».

Les récipients peuvent être marqués pour indiquer le volume d'une demi-dose, par exemple, pour faciliter l'administration à des enfants. Par exemple, une seringue contenant une dose de 0,5 ml peut comporter une marque indiquant un volume de 0,25 ml.

Lorsqu'un récipient en verre (par exemple, une seringue ou un flacon) est utilisé, alors il est préférable d'utiliser un récipient fait d'un verre borosilicate plutôt que d'un verre sodo-calcique.

Les compositions fabriquées en utilisant les procédés de l'invention sont pharmaceutiquement acceptables. Elles peuvent comprendre des composants en plus de l'émulsion et de l'antigène éventuel.

La composition peut comprendre un conservateur comme le thiomersal ou le 2-phénoxyéthanol. Toutefois, il est préférable que l'adjuvant ou le vaccin soit substantiellement dépourvu de (c'est-à-dire, moins de 5 µg/ml) de matériau mercuriel, c'est-à-dire, dépourvu de thiomersal [49,50]. Les vaccins et les composants ne contenant pas de mercure sont davantage préférés.

Le pH d'une composition sera généralement entre 5,0 et 8,1, et plus généralement entre 6,0 et 8,0, par exemple, entre 6,5 et 7,5. Un procédé de l'invention peut donc comprendre une étape d'ajustement du pH de l'adjuvant du vaccin avant le conditionnement.

La composition est de préférence stérile. La composition est de préférence non pyrogène, par exemple, contenant < 1 UE (unité d'endotoxine, une mesure classique) par dose, et de préférence < 0,1 UE par dose. La composition est de préférence dépourvue de gluten.

La composition peut comprendre du matériau pour une seule immunisation, ou il peut comprendre du matériau pour des immunisations multiples (c'est-à-dire, un kit 'multidose'). L'inclusion d'un conservateur est préférée dans des arrangements multidoses.

Les compositions peuvent être administrées de diverses façons. La voie d'immunisation préférée entre toutes est par injection intramusculaire (par exemple, dans le bras ou la jambe), mais d'autres voies disponibles comprennent une injection sous-cutanée, une administration intranasale [51-53], orale [54], intradermique [55,56], transcutanée, transdermique [57] etc.

Les adjuvants ou les vaccins préparés selon l'invention peuvent être utilisés pour traiter à la fois des enfants et des adultes. Le patient peut avoir un âge inférieur à 1 an, de 1 à 5 ans, de 5 à 15 ans, de 15 à 55 ans, ou au moins 55 ans. Le patient peut être une personne âgée (par exemple, ≥ 50 ans, de préférence ≥ 65 ans), un jeune (par exemple, ≤ 5 ans), un patient hospitalisé, un professionnel de santé, un membre du personnel des services armés et militaires, une femme enceinte, un malade chronique, un patient immunodéficient, et un voyageur à l'étranger. Les vaccins ne sont pas appropriés

uniquement pour ces groupes, toutefois, et ils peuvent être utilisés plus généralement dans une population.

Les adjuvants ou les vaccins de l'invention peuvent être administrés à des patients substantiellement en même temps (par exemple, durant la même consultation médicale ou visite à un professionnel de la santé) que d'autres vaccins.

Définitions

Le terme « comprenant » englobe « incluant » ainsi que « constitué de », par exemple, une composition « comprenant » X peut être constituée exclusivement de X ou elle peut comprendre quelque chose d'autre, par exemple, X + Y.

Le terme « substantiellement » n'exclut pas « complètement », par exemple, une composition qui est « substantiellement dépourvue » de Y peut être complètement dépourvue de Y. Lorsque c'est nécessaire, le terme « substantiellement » peut être omis de la définition de l'invention.

Le terme « environ » en relation avec une valeur numérique x est facultatif et signifie, par exemple, x ± 10 %.

Telles qu'utilisées dans la présente, les formes au singulier « un », « une », « le » et « la » comprennent les articles au pluriel sauf si le contexte indique clairement le contraire.

Sauf indication contraire, un procédé comprenant une étape de mélange de deux composants ou plus ne requiert aucun ordre spécifique de mélange. Ainsi, les composants peuvent être mélangés dans n'importe quel ordre. Lorsqu'il y a trois composants, alors deux composants peuvent être combinés l'un avec l'autre, et ensuite la combinaison peut être combinée avec le troisième composant, etc.

Lorsque des matériaux animaux (et particulièrement bovins) sont utilisés dans la culture des cellules, ils

devront être obtenus de sources qui sont dépourvues d'encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), et en particulier dépourvus de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). Globalement, il est préférable de cultiver les cellules en l'absence totale de matériaux d'origine animale.

Modes de réalisation de l'invention

Les exemples présentés ci-dessous sont à titre d'illustration et ne sont pas censés limiter la portée de l'invention.

1/ Formation d'une émulsion huile dans l'eau et mesure de la taille moyenne des particules

Les compositions d'huile/tensioactif comprenant du squalène, du Span 85 et du Tween 80 ont été préparées avec les pourcentages des compositions présentés dans les tableaux 1 et 2. Ces compositions ont été mélangées à 37 - 40 °C pendant une nuit. Le jour suivant, les compositions huileuses ont été mélangées avec du matériau aqueux en ajoutant la composition d'huile/tensioactif au matériau aqueux dans un rapport de 1/10 (huile/tensioactif sur eau) (volume/volume) à température ambiante ; il a été observé que les émulsions huile dans l'eau se sont formées spontanément. La taille moyenne des particules d'huile des diverses émulsions a été mesurée en utilisant un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) selon les instructions du fabricant (pour donner une moyenne Z et un IPd), ou un instrument de mesure de la taille des particules à haut débit Wyatt DynaPro (par l'intensité). Les résultats de cette étude sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1

| ID de l'émulsion | Squalène (% en vol.) | Span 85 (% en vol.) | Tween 80 (% en vol.) | Diamètre en moyenne Z des particules d'huile (nm) | IPd | Diamètre à débit élevé (nm) |
|---|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SEA01 | 20 | 70 | 10 | | | 150,1 |
| SEA04 | 30 | 50 | 20 | | | 128,7 |
| SEA05 | 40 | 40 | 20 | 43,15 | 0,1 | |
| SEA06 | 30 | 40 | 30 | 94,87 | 0,069 | |
| SEA08 | 40 | 50 | 10 | | | 202,4 |
| SEA10 | 50 | 30 | 20 | 172 | 0,055 | |
| SEA11 | 40 | 30 | 30 | 115,4 | 0,138 | |
| SEA15 | 20 | 60 | 20 | | | 221,0 |
| SEA25 | 10 | 50 | 40 | | | 191,3 |
| SEA26 | 10 | 60 | 30 | | | 206,5 |
| SEA27 | 10 | 70 | 20 | | | 196,7 |
| SEA28 | 10 | 80 | 10 | | | 217,1 |

Tableau 2

| ID de l'émulsion | Squalène (% en vol.) | Span 85 (% en vol.) | Tween 80 (% en vol.) | Diamètre en moyenne Z des particules d'huile (nm) | IPd | Diamètre à débit élevé (nm) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SEA12 | 30 | 30 | 40 | 23,19 | 0,144 | 25,2 |
| SEA19 | 40 | 20 | 40 | 19,48 | 0,146 | 20,5 |
| SEA20 | 30 | 20 | 50 | 17,48 | 0,142 | 18,2 |
| SEA29 | 10 | 10 | 80 | 11,32 | 0,104 | 11,3 |

Les compositions d'huile/tensioactif comprenant du squalène, du Span 85 et du Tween 80 ont été préparées avec les pourcentages des compositions présentés dans le tableau 3 ci-dessous. Ces compositions ont été combinées avec du matériau aqueux en ajoutant la composition d'huile/tensioactif au matériau aqueux dans un rapport de 1/10 (huile/tensioactif sur eau) (volume/volume) à température ambiante et il a été observé que les émulsions huile dans l'eau ne se sont pas formées spontanément ou une émulsion s'est formée mais en ayant une taille moyenne de particule d'huile de 250 nm ou supérieure. La taille moyenne des particules d'huile de diverses émulsions a été mesurée en utilisant un instrument de mesure de la taille des particules à débit élevé Wyatt DynaPro (par l'intensité) selon les instructions du fabricant.

Tableau 3

| ID de l'émulsion | Squalène (% en vol.) | Span 85 (% en vol.) | Tween 80 (% en vol.) | Diamètre moyen des particules d'huile (nm) |
|---|---|---|---|---|
| SEA07 | 30 | 60 | 10 | - |
| SEA09 | 50 | 40 | 10 | 251,4 |
| SEA13 | 20 | 40 | 40 | - |
| SEA14 | 20 | 50 | 30 | - |
| SEA16 | 70 | 20 | 10 | - |
| SEA17 | 60 | 20 | 20 | - |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| SEA18 | 50 | 20 | 30 | - |
| SEA21 | 20 | 20 | 60 | - |
| SEA22 | 10 | 20 | 70 | - |
| SEA23 | 10 | 30 | 60 | - |
| SEA24 | 10 | 40 | 50 | 289,4 |
| SEA30 | 20 | 10 | 70 | 350,3 |
| SEA31 | 30 | 10 | 60 | 423,6 |
| SEA32 | 40 | 10 | 50 | 340,3 |
| SEA33 | 50 | 10 | 40 | - |
| SEA34 | 60 | 10 | 30 | - |
| SEA35 | 70 | 10 | 20 | - |
| SEA36 | 80 | 10 | 10 | 316,2 |

Comme il est montré dans le tableau 1, les émulsions huile dans l'eau selon la présente invention peuvent avoir une taille moyenne des particules d'huile inférieure à 200 nm. Les émulsions huile dans l'eau selon certains modes de réalisation de l'invention peuvent avoir une taille moyenne des particules d'huile qui n'est pas supérieure à 40 nm comme il est montré dans le tableau 2.

2/ Formation d'une émulsion huile dans l'eau et mesure de la taille moyenne des particules

400 µl de squalène, 400 µl de Span 85 (trioléate de sorbitane), et 200 µl de Tween 80 (polysorbate 80 ; monooléate de sorbitane polyoxyéthylène) ont été mélangés ensemble pour former une composition de 1 ml selon la présente invention. Après la formation de la composition contenant de l'huile et du tensioactif, ladite composition a été ajoutée à 19 ml d'une phase aqueuse comprenant de l'eau pour former un mélange de 20 ml. Le mélange résultant a été ensuite inversé doucement à la main, entraînant la formation d'une émulsion huile dans l'eau selon la présente invention. La taille moyenne des particules de gouttelettes d'huile dans l'émulsion huile dans l'eau a été mesurée comme étant de 43,15 nm.

Cette expérience a été répétée avec diverses combinaisons différentes de squalène, de Span 85 et de Tween 80 selon la présente invention. Les résultats de ces expériences sont

présentés dans le tableau 4 ci-dessous. Pour référence, les données correspondantes pour l'adjuvant connu MF59 sont également fournies dans le tableau 4. Les diamètres moyens des particules d'huile de chaque émulsion ont été mesurés en utilisant un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni) selon les instructions du fabricant.

Tableau 4

| ID de l'émulsion | Squalène (µl) | Span 85 (µl) | Tween 80 (µi) | Squalène comparé au MF59 | Span 85 comparé au MF59 | Tween 80 comparé au MF59 | Diamètre des particules (nm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SEA05 | 400 | 400 | 200 | 40 % | 400 % | 200 % | 43,15 |
| SEA10 | 500 | 300 | 200 | 50 % | 300 % | 200 % | 172 |
| SEA11 | 400 | 300 | 300 | 40 % | 300 % | 300 % | 115,4 |
| SEA19 | 400 | 200 | 400 | 40 % | 200 % | 400 % | 19,48 |
| MF59 | 1000 | 100 | 100 | 100 % | 100 % | 100 % | ~160 |

Comme il est démontré dans le tableau 4, chacune des émulsions testées avait une taille moyenne des particules d'huile inférieure à 175 nm. En particulier, il a été trouvé que l'émulsion SEA19 avait une taille de particule de squalène inférieure à 20 nm.

Par conséquent, la présente invention permet la fabrication d'émulsions huile dans l'eau hautement dispersées ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm. La présente invention permet également la fabrication d'émulsions huile dans l'eau hautement dispersées avec de très petites particules d'huile (squalène) ayant un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm. En outre, les petites tailles de particules sont obtenues sans le besoin de procédés coûteux comme une microfluidisation.

Le tableau 4 montre également les pourcentages relatifs de chaque composant dans l'émulsion comparativement à la quantité correspondante de chaque composant dans l'adjuvant de

vaccin connu MF59. Par exemple, la composition SEA19 de la présente invention contient seulement deux cinquièmes de la quantité de squalène présente dans le MF59, deux fois autant de Span 85, et quatre fois autant de Tween 80 que le MF59, et a un diamètre moyen de particule qui est plus de huit fois plus petit que celui dans le MF59. De façon générale, chacune des émulsions testées dans l'exemple 2 contenait une quantité inférieure ou égale à la moitié de la quantité de squalène présente dans l'adjuvant de vaccin MF59. En outre, les émulsions de la présente invention testées dans l'exemple 2 contiennent n'importe où entre deux et quatre fois la quantité de chaque tensioactif trouvée dans le MF59.

3/ Analyse in vivo des émulsions huile dans l'eau pour leur utilisation potentielle en tant qu'adjuvants

Dans cette expérience, l'émulsion huile dans l'eau SEA19 de l'exemple 2 a été testée in vivo pour sa capacité à amplifier une réponse immunitaire chez un sujet. Il a été également réalisé des expériences comparatives, dans lesquelles aucun adjuvant ou l'adjuvant connu MF59 a été administré à la place de l'émulsion SEA19. En outre, des concentrations de doses variables de l'émulsion SEA19 ont été testées.

Chaque expérience énumérée dans le tableau 5 a été réalisée sur deux groupes de souris, chaque groupe constitué de quatre souris. Il a été administré à chaque groupe 1 ou 10 µg des antigènes grippaux (souche Brisbane) en combinaison avec l'adjuvant MF59, SEA19 ou aucun adjuvant conformément aux expériences présentées dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5

| Nom de l'adjuvant | Dose d'adjuvant | Dose d'antigène | ELISA moyen |
|---|---|---|---|
| (Aucun) | – | 10 µg | 28686 |
| (Aucun) | – | 1 µg | 14599 |
| MF59 | 1x | 10 µg | 267761 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| MF59 | 1x | 1 µg | 170368 |
| SEA19 | 1x | 10 µg | 99058 |
| SEA19 | 1x | 1 µg | 104406 |
| SEA19 | 0,1x | 10 µg | 42053 |
| SEA19 | 0,1x | 1 µg | 25392 |
| SEA19 | 0,01x | 10 µg | 48296 |
| SEA19 | 0,01x | 1 µg | 21174 |

Comme il est démontré dans le tableau 5, l'émulsion SEA19 de la présente invention a été efficace dans l'induction d'une réponse immunitaire contre l'antigène grippal. Par conséquent, les émulsions de la présente invention sont appropriées pour une utilisation en tant qu'adjuvant, par exemple dans des vaccins.

4/ Variantes d'huiles et de tensioactifs

La composition de SEA20 telle que présentée ci-dessus a été définie plus précisément en se basant sur un rapport de volume de 600/200/1400 (squalène/trioléate de sorbitane/ polysorbate 80), menant ainsi à 27,3 % en volume de squalène, 9,1 % de trioléate de sorbitane, et 63,6 % de polysorbate 80. Lors de la combinaison avec un excès de 19 fois de matériau aqueux (1,1 ml de mélange avec 19 ml de tampon citrate 100 mM, pH 6,5), ce mélange SEA20 donne une émulsion avec des gouttelettes d'un diamètre de ~20 nm, avec un IPd de ~0,1.

Tandis que les trois composants dans SEA20 comportent un volume en excès de tensioactif, les mêmes composants peuvent être combinés dans des rapports différents avec un volume en excès de squalène. Au contraire de SEA20, avec 70 % en volume de squalène, ce mélange fournit une émulsion avec des gouttelettes d'un diamètre de ~160 nm, également avec un IPd de ~0,1.

L'huile et les tensioactifs dans ces deux émulsions ont été variés. Trois variantes d'huiles ont été utilisées

(squalane, huile de soja, huile de graines de tournesol) et trois variantes de tensioactifs de BHL élevée (polysorbate 20, BHL de 16,7 ; SDS, BHL de 40 ; ou éther laurylique de polyoxyéthylène (10), BHL de 17) dans les mêmes volumes (sauf pour le SDS, qui a été utilisé au même poids). Ces variantes d'émulsion présentaient les caractéristiques suivantes :

| Huile (µl) | | Span 85 (µl) | BHL élevée (µL) | | Diamètre (nm) | IPd | Commentaires de stabilité |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SEA20 et variations | | | | | | | |
| Squalène | 600 | 200 | Polysorbate 80 | 1400 | ~20 | ~0,09 | Limpide |
| Squalane | 600 | 200 | Polysorbate 80 | 1400 | 704,7 | 0,759 | Trouble, formation de crème |
| Soja | 600 | 200 | Polysorbate 80 | 1400 | 126,3 | 0,285 | Trouble, formation de crème |
| Tournesol | 600 | 200 | Polysorbate 80 | 1400 | 180,8 | 0,385 | Trouble |
| Squalène | 600 | - | Polysorbate 80 | 1600 | 15,14 | 0,068 | Limpide |
| Squalène | 600 | - | Polysorbate 80 | 1400 | 79,44 | 0,418 | Trouble |
| Squalène | 600 | - | Polysorbate 20 | 1600 | 941,1 | 1 | Laiteux |
| Squalène | 600 | 200 | Polysorbate 20 | 1400 | 477,4 | 0,93 | Laiteux |
| Squalène | 600 | - | Polysorbate 20 | 1400 | 789,8 | 0,622 | Trouble |
| Squalène | 600 | 200 | SDS | 756 | 432,3 | 0,477 | Trouble |
| Squalène | 300 | - | SDS | 756 | 2598 | 0,519 | Trouble |
| Squalène | 600 | 200 | POE 10 LE | 1400 | - | - | Phase huileuse = pâte |
| Variantes de mélange, et variations | | | | | | | |
| Squalane | 1400 | 300 | Polysorbate 80 | 300 | 387,3 | 0,491 | Laiteux |
| Soja | 1400 | 300 | Polysorbate 80 | 300 | 1046 | 0,659 | Laiteux |
| Tournesol | 1400 | 300 | Polysorbate 80 | 300 | 650,8 | 0,709 | Laiteux |
| Squalène | 1400 | - | Polysorbate 80 | 600 | 2530 | 1 | Formation de crème |
| Squalène | 1400 | - | Polysorbate 80 | 300 | 1757 | 0,995 | Formation de crème |
| Squalène | 1400 | - | Polysorbate 20 | 600 | 1478 | 0,777 | Formation de crème |
| Squalène | 1400 | 300 | Polysorbate 20 | 300 | 487 | 0,561 | Trouble, formation de crème |
| Squalène | 1400 | - | Polysorbate 20 | 300 | 1517 | 0,991 | Formation de crème |
| Squalène | 1400 | 300 | SDS | 162 | 1081 | 0,832 | Trouble |
| Squalène | 700 | - | SDS | 162 | 3183 | 0,792 | Trouble |
| Squalène | 1400 | 300 | POE 10 LE | 300 | - | - | Séparé |

Ainsi, aucune des variantes d'huiles n'a été un substitut approprié pour le squalène, et aucune des variantes de composants tensioactifs n'a été non plus utile.

Il faudra comprendre que l'invention a été décrite à titre d'exemple uniquement et que des modifications peuvent être réalisées tout en demeurant au sein de la portée et de l'esprit de l'invention. Les modes de réalisation au sein de la description fournissent une illustration des modes de réalisation de l'invention et ne devront pas être interprétés comme limitant la portée de l'invention. L'homme du métier

comprend que de nombreux autres modes de réalisation sont englobés par l'invention.

Références

[1] WO 90/14837.

[2] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.

[3] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.

[4] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

[5] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.

[6] New Generation Vaccines (eds. Levine et al.). 3rd edition, 2004. ISBN 0-8247-4071-8.

[7] O'Hagan (2007) Expert Rev Vaccines 6(5):699-710.

[8] Garçon et al. (2012) Expert Rev Vaccines 11:349-66.

[9] WO 2006/100109.

[10] US 2007/0014805.

[11] Ott et al. (2000) Chapter 12 of Vaccine Adjuvants: Preparation methods and research protocols (ed. O'Hagan), volume 42 of Methods in Molecular Medicine.

[12] Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions (W. Schartl), 2007. ISBN: 978-3-540-71950-2.

[13] WO 90/04609.

[14] WO 2011/067669

[15] Lidgate et al (1992) Pharmaceutical Research 9(7):860-863.

[16] Hoffmann et al. (2002) Vaccine 20:3165-3170.

[17] Subbarao et al. (2003) Virology 305:192-200.

[18] Liu et al. (2003) Virology 314:580-590.

[19] Ozaki et al. (2004) J. Virol. 78:1851-1857.

[20] Webby et al. (2004) Lancet 363:1099-1103.

[21] WO 97/37000.

[22] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.

[23] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240-7.

[24] Tree et al. (2001) Vaccine 19:3444-50.

[25] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960-8.

[26] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.

[27] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149-58.

[28] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716-21.

[29] WO 01/22992.

[30] Hehme et al. (2004) Virus Res. 103(1-2):163-71.

[31] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173:1467-70.

[32] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.

[33] Williamson et al. (2006) Infection and Immunity 74: 961-7.

[34] Loukas et al. (2005) PLoS Med 2(10): e295.

[35] EP-A-0139417.

[36] Harper et al. (2004) Lancet 364(9447):1757-65.

[37] J Toxicol Clin Toxicol (2001) 39:85-100.

[38] Demicheli et al. (1998) Vaccine 16:880-884.

[39] Stepanov et al. (1996) J Biotechnol 44:155-160.

[40] WO 2007/052155.

[41] WO 2005/089837.

[42] US 6 692 468.

[43] WO 00/07647.

[44] WO 99/17820.

[45] US 5 971 953.

[46] US 4 060 082.

[47] EP-A-0520618.

[48] WO 98/01174.

[49] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96.

[50] WO 02/097072.

[51] Greenbaum et al. (2004) Vaccine 22:2566-77.

[52] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304.

[53] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-30.

[54] Mann et al. (2004) Vaccine 22:2425-9.

[55] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69:1247-50.

[56] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140:234-8.

[57] Chen et al. (2003) Vaccine 21:2830-6.

REVENDICATIONS

1. Composition d'huile/tensioactif pharmaceutiquement acceptable pour une utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm, ladite composition comprenant

(i) du squalène ; et

(ii) un composant tensioactif biocompatible, métabolisable, comprenant au moins un tensioactif, où : (a) le composant tensioactif a une valeur de BHL de 2,5 à 9,0 ; (b) le composant tensioactif a une valeur de BHL de 3,3 à 8,4 ; (c) le composant tensioactif a une valeur de BHL de 10 à 18 ; (d) le composant tensioactif a une valeur de BHL de 13 à 17 ; (e) le composant tensioactif a une valeur de BHL de 14 à 16 ; ou (f) le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9 à 14,

où la composition d'huile/tensioactif est substantiellement dépourvue de composants aqueux.

2. Composition d'huile/tensioactif selon la revendication 1, dans laquelle le composant tensioactif comprend ou est constitué de polysorbate 80.

3. Composition d'huile/tensioactif selon la revendication 1, dans laquelle : (a) le composant tensioactif a une valeur de BHL de 2,5 à 9,0 et l'émulsion huile dans l'eau a un diamètre moyen de particule d'huile entre 40 et 250 nm ; ou (b) le composant tensioactif a une valeur de BHL de 9,0 à 14,0 et l'émulsion huile dans l'eau a un diamètre moyen de particule d'huile qui n'est pas supérieur à 40 nm.

4. Composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle : (a) la composition comprend un volume en excès de squalène par rapport au composant tensioactif ; ou (b) la composition comprend un volume en excès du composant tensioactif par rapport au squalène.

5. Composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant (en volume) 60 à 80 % de squalène (par exemple, 65 à 75 % de squalène, ou 70 % de squalène), avec le reste étant du polysorbate 80 ou une combinaison de polysorbate 80 et de trioléate de sorbitane.

6. Composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle (a) la composition comprend du squalène et du polysorbate 80, et le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 est de 70 à 90 % du volume total de la composition d'huile/tensioactif ; ou (b) la composition comprend du squalène, du trioléate de sorbitane et du polysorbate 80, et le % en volume combiné du squalène et du polysorbate 80 est de 70 à 90 % du volume total de squalène, de trioléate de sorbitane et de polysorbate 80 dans la composition d'huile/tensioactif.

7. Emulsion huile dans l'eau comprenant la composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des revendications précédentes en combinaison avec une phase aqueuse, où ladite émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm, de préférence dans la plage de 20 à 200 nm.

8. Procédé de formation d'une émulsion huile dans l'eau comprenant

(i) du squalène ; et

(ii) un composant tensioactif biocompatible, métabolisable comprenant au moins un tensioactif ;

où le composant tensioactif a une valeur de BHL de (a), (b), (c), (d), (e) ou (f) telle que définie dans la revendication 1, et où l'émulsion a un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm ;

ledit procédé comprenant :

a) la fourniture d'une composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ;

b) la fourniture d'une phase aqueuse ;

c) la combinaison de la composition d'huile/tensioactif avec un volume en excès de la phase aqueuse pour former une composition diluée ; et

d) le mélange léger de la composition diluée pour former une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250 nm.

9. Emulsion huile dans l'eau selon la revendication 7, pour une utilisation en tant qu'adjuvant.

10. Composition immunogène comprenant une émulsion huile dans l'eau selon la revendication 7, et un composant antigène.

11. Procédé de préparation d'une composition immunogène comprenant le mélange d'une émulsion huile dans l'eau selon la revendication 7, avec un composant antigène.

12. Kit comprenant :

SOIT

(i) une composition d'huile/tensioactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ;

(ii) une phase aqueuse ; et éventuellement

(iii) des instructions pour combiner la composition d'huile/tensioactif et la phase aqueuse,

SOIT

(i) une émulsion huile dans l'eau selon la revendication 7 ; et

(ii) un composant antigène.

13. Matériau séché qui, lorsqu'il est reconstitué avec une phase aqueuse, fournit une émulsion huile dans l'eau selon la revendication 7.

14. Kit pour préparer une émulsion huile dans l'eau selon la revendication 7, où le kit comprend :

(i) une émulsion huile dans l'eau selon la revendication 7 sous forme séchée ; et

(ii) une phase aqueuse.

Numero de la demande nationale

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

BO 11092
BE 201505157

## DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | Revendication concernée | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC) |
|---|---|---|---|
| A | MARCO ANTONIO MORENO ET AL: "Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: Pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 92, no. 7, 16 juillet 2003 (2003-07-16), pages 1428-1437, XP055120041, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.10412 * abrégé * * page 1429, colonne 1, alinéa 3 - colonne 2, alinéa 4 * * page 1430, colonne 2, alinéa 5 * * tableaux 2-4 * ----- | 1-14 | INV. A61K39/39 |
| X | LI P ET AL: "Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 288, no. 1, 6 janvier 2005 (2005-01-06), pages 27-34, XP027623841, ISSN: 0378-5173 [extrait le 2005-01-06] * abrégé * * page 29, colonne 1, dernier alinéa - colonne 2, alinéa 3; tableau 1 * * page 34, colonne 1, dernier alinéa * ----- -/-- | 1-14 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) A61K |

1

| Date d'achèvement de la recherche | Examinateur |
|---|---|
| 26 février 2016 | Noë, Veerle |

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

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

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

Numero de la demande nationale

BO 11092
BE 201505157

# RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

## DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | Revendication concernée | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC) |
|---|---|---|---|
| A | SHIVELY M L: "MULTIPLE EMULSIONS FOR THE DELIVERY OF PROTEINS", PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, KLUWER, DORDRECHT, NL, vol. 10, 1 janvier 1997 (1997-01-01), pages 199-211, XP008018109, ISSN: 1078-0467 * page 200, dernier alinéa - page 201, alinéa 1 * | 1 | |
| X | WO 96/32964 A1 (SEPPIC SA [FR]; GANNE VINCENT [FR]) 24 octobre 1996 (1996-10-24) * page 4, ligne 9 - page 6, dernière ligne; revendications 9-11 * * page 10, lignes 2-6 * * page 13, lignes 6-13 * * page 13, ligne 32 - dernière ligne * | 1-4,7-14 | |
| X | WO 2010/125461 A1 (NOVARTIS AG [CH]; STOEHR KLAUS [US]; DORMITZER PHILIP [US]; DEL GIUDIC) 4 novembre 2010 (2010-11-04) * page 12, ligne 6 - page 13, ligne 33 * * page 24, lignes 32-36 * | 7,9-12 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) |
| X | BAGWE R P ET AL: "IMPROVED DRUG DELIVERY USING MICROEMULSIONS: RATIONALE, RECENT PROGESS, AND NEW HORIZONS", CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS, BEGELL HOUSE PUBLISHING INC, US, vol. 18, no. 1, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 77-140, XP001135019, ISSN: 0743-4863 * page 88, alinéa 3 - page 89, alinéa 2 * | 1-14 | |

-/--

1

| Date d'achèvement de la recherche | Examinateur |
|---|---|
| 26 février 2016 | Noë, Veerle |

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

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

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

Numero de la demande nationale

BO 11092
BE 201505157

# RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

## DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | Revendication concernée | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC) |
|---|---|---|---|
| X | WO 2012/103421 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BRITO LUIS [US]; SINGH MANMOHAN [US]; O'HAGAN DEREK) 2 août 2012 (2012-08-02)<br>* page 3, lignes 23-25 *<br>* page 4, lignes 14-16 *<br>* page 4, ligne 23 - page 5, ligne 5 *<br>* page 6, ligne 22 - page 7, ligne 22 *<br>----- | 7,9-12 | |
| | | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) |

| Date d'achèvement de la recherche | Examinateur |
|---|---|
| 26 février 2016 | Noë, Veerle |

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

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

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

## ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.

BO 11092
BE 201505157

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

26-02-2016

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|---|---|---|
| WO 9632964 A1 | 24-10-1996 | AU 695802 B2 | 20-08-1998 |
| | | AU 5696896 A | 07-11-1996 |
| | | BR 9608067 A | 26-01-1999 |
| | | CN 1184431 A | 10-06-1998 |
| | | DE 69608962 D1 | 27-07-2000 |
| | | DE 69608962 T2 | 16-11-2000 |
| | | EP 0825875 A1 | 04-03-1998 |
| | | ES 2147924 T3 | 01-10-2000 |
| | | FR 2733151 A1 | 25-10-1996 |
| | | JP 3455226 B2 | 14-10-2003 |
| | | JP H11503743 A | 30-03-1999 |
| | | JP 2002193841 A | 10-07-2002 |
| | | NO 974837 A | 20-10-1997 |
| | | US 6251407 B1 | 26-06-2001 |
| | | US 6274149 B1 | 14-08-2001 |
| | | US 6342234 B1 | 29-01-2002 |
| | | US 2001033845 A1 | 25-10-2001 |
| | | US 2002164359 A1 | 07-11-2002 |
| | | WO 9632964 A1 | 24-10-1996 |
| WO 2010125461 A1 | 04-11-2010 | BE 1019643 A3 | 04-09-2012 |
| | | CA 2763816 A1 | 04-11-2010 |
| | | CN 102548577 A | 04-07-2012 |
| | | DE 102010018462 A1 | 07-04-2011 |
| | | EP 2424565 A1 | 07-03-2012 |
| | | FR 2949344 A1 | 04-03-2011 |
| | | JP 2012525370 A | 22-10-2012 |
| | | KR 20120027276 A | 21-03-2012 |
| | | US H2283 H1 | 03-09-2013 |
| | | US H2284 H1 | 03-09-2013 |
| | | WO 2010125461 A1 | 04-11-2010 |
| WO 2012103421 A1 | 02-08-2012 | EP 2667852 A1 | 04-12-2013 |
| | | US 2014017279 A1 | 16-01-2014 |
| | | WO 2012103421 A1 | 02-08-2012 |

EPO FORM P0463

# OPINION ÉCRITE

| Dossier N° | Date du dépot *(jour/mois/année)* | Date de priorité *(jour/mois/année)* | Demande n° |
|---|---|---|---|
| BO11092 | 17.03.2015 | 17.03.2014 | BE201505157 |

Classification internationale des brevets (CIB)
INV. A61K39/39

Déposant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☒ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- ☒ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

| | Examinateur |
|---|---|
| | Noë, Veerle |

Demande n°
BE201505157

# OPINION ÉCRITE

## Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.

2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :

   a. Nature de l'élément:

   ☐ un listage de la ou des séquences

   ☐ un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences

   b. Type de support:

   ☐ sur papier

   ☐ sous forme électronique

   c. Moment du dépôt ou de la remise:

   ☐ contenu(s) dans la demande telle que déposée

   ☐ déposé(s) avec la demande, sous forme électronique

   ☐ remis ultérieurement

3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.

4. Commentaires complémentaires :

## Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

| | | | |
|---|---|---|---|
| Nouveauté | Oui : | Revendications | 5, 6 |
| | Non : | Revendications | 1-4, 7-14 |
| Activité inventive | Oui : | Revendications | |
| | Non : | Revendications | 1-14 |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : | Revendications | 1-14 |
| | Non : | Revendications | |

2. Citations et explications

**voir feuille séparée**

## Cadre n° VII Irrégularités dans la demande

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

## Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

**voir feuille séparée**

**Ad point V**

1.1 **Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1.2 Il est fait référence aux documents suivants :

D1 MARCO ANTONIO MORENO ET AL: "Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: Pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies",
JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES,
vol. 92, no. 7, 16 juillet 2003 (2003-07-16), pages 1428-1437, XP055120041,
ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.10412

D2 LI P ET AL: "Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions",
INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL,
vol. 288, no. 1, 6 janvier 2005 (2005-01-06), pages 27-34, XP027623841,
ISSN: 0378-5173
[extrait le 2005-01-06]

D3 SHIVELY M L: "MULTIPLE EMULSIONS FOR THE DELIVERY OF PROTEINS",
PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, KLUWER, DORDRECHT, NL,
vol. 10, 1 janvier 1997 (1997-01-01), pages 199-211, XP008018109,
ISSN: 1078-0467

D4 WO 96/32964 A1 (SEPPIC SA [FR]; GANNE VINCENT [FR]) 24 octobre 1996 (1996-10-24)

D5 WO 2010/125461 A1 (NOVARTIS AG [CH]; STOEHR KLAUS [US]; DORMITZER PHILIP [US]; DEL GIUDIC) 4 novembre 2010 (2010-11-04)

D6 BAGWE R P ET AL: "IMPROVED DRUG DELIVERY USING MICROEMULSIONS: RATIONALE, RECENT PROGESS, AND NEW HORIZONS",
CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS,

BEGELL HOUSE PUBLISHING INC, US,
vol. 18, no. 1, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 77-140, XP001135019, ISSN: 0743-4863

D7 WO 2012/103421 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BRITO LUIS [US]; SINGH MANMOHAN [US]; O'HAGAN DEREK) 2 août 2012 (2012-08-02)

## 2 NOUVEAUTÉ

2.1 D4 décrit une composition immunogène comprenant un adjuvant qui comprend une microémulsion huile dans l'eau comprenant un huile biocompatible et métabolisable e.g. squalène et un composant tensioactif à une valeur de BHL de 1 à 19. Le composant tensioactif est mélangé avec l'huile avant que l' émulsion est formée en mélangeant les composées (page 4, ligne 9- page 6; page 10, lignes 2-6; page 13, lignes 6-13 et lignes 32-34). Même si D4 ne décrit pas le diamètre de particule d'huile, cette caractéristique est considérée comme inhérente à une microémulsion. Le matériau séché de la revendication 13 corresponds à la composition de la revendication 1, car cette composition ne contient pas la phase aqueuse. Au vue de D4, l'objet des revendications 1-4,7-14 n'est pas nouveau.

2.2 D5 décrit une composition vaccinale comprenant une émulsion huile dans l'eau ayant toutes les caractéristiques de l'émulsion de la revendication 7, même si elle n'a pas été produite à partir de la composition de la revendication 1. Cette émulsion huile dans l'eau ne peut pas être distinguée de l' émulsion de la revendication 7 qui à été produite par un autre procédé. Au vue de D5, l'objet des revendications 7,9-12 n'est pas nouveau.

2.3 D7 décrit une émulsion huile dans l'eau comprenant tous les composants de la de la composition d'huile/tensioactif des revendications 1-6 en combinaison avec une phase aqueuse. Les gouttelette d'huile ont un diamètre moyen <250 nm. L'émulsion de D7 est utilisée en tant qu'adjuvant. Au vue de D7, l'objet des revendications 7,9-12 n'est pas nouveau.

2.4 La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications 1-4, 7-14 n'étant pas nouveau.

## 3 ACTIVITÉ INVENTIVE

3.1 Les revendications dépendantes 5 et 6 ne semblent pas contenir de caractéristiques supplémentaires qui, en combinaison avec l'objet de l' une quelconque des revendications dont elles dépendent, impliqueraient une activité inventive car l'homme du métier aurait testé de proportions différentes de squalène et de polysorbate 80 pour formuler une émulsion.

3.2 Les revendications ne sont pas considérées comme inventives parce qu' elles ne résolvent pas le problème de fournir une composition pour l'utilisation dans un procédé de formulation d'une émulsion huile dans l'eau dont les gouttelettes d'huile ont un diamètre moyen inférieur à 250 nm. Il est clair de la demande (voir Tableaux 1 et 2 comparés au Tableau 3) et de la littérature (e.g. D6, page 88, alinéa 3 - page 89, alinéa 2) que n'importe quelle combinaison de squalène et n'importe quelle tensioactif biocompatible et métabolisable avec une valeur de BHL de 2,5 à 9, de 3,3 à 8,4, de 13 à 17, de 14 à 16 ou de 9 à 14 en n'importe quelles quantités, ne produira pas une émulsion huile dans l'eau avec un diamètre de particule d'huile qui est inférieur à 250nm (D2 indique que 2 surfactants nonioniques sont nécessaire pour obtenir une nanoémulsion). La production de microémulsions par le mélange léger de la composition d'huile/tensioactif avec la phase aqueuse est bien connue dans l'art antérieur. Déterminer quels tensioactifs en quelles quantités/proportions de squalène et tensioactifs produiraient une microémulsion comme revendiquée, est considéré comme un effort excessif pour l'homme du métier.

3.3 La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications 1-14 n'impliquant pas d'activité inventive.

## 4 SUPPORT

4.1 Les revendications ont trait à des compositions d'huile/tensioactif, des émulsions huile dans l'eau comprenant la composition d'huile/tensioactif, des procédés de formation d' une émulsion huile dans l'eau, l'utilisation de l' émulsion en tant qu'adjuvant, une composition immunogène comprenant l' émulsion huile dans l'eau, un procédé de préparation d'une composition immunogène, un kit comprenant la composition d'huile/tensioactif. Seules des compositions huile/tensioactif comprenant squalène comme huile et une combinaison de Span 85 et Tween 80 dans les quantités spécifiées dans les tableaux 1 et 2 de la demande ont été montré à être capable de former une émulsion huile dans l'eau avec un diamètre de particule d'huile qui est inférieur à 250nm. La présente demande montre que les quantités/

proportions de squalène, Span 85 et Tween 80 sont très importantes pour obtenir une émulsion huile dans l'eau avec un diamètre de particule d'huile qui est inférieur à 250nm ou ne pas supérieur à 40nm. Ces quantités/ proportions sont aussi importantes pour obtenir une émulsion stable ((D6, page 88, alinéa 3 - page 89, alinéa 2 et Tableaux 1 et 2 comparés au Tableau 3 de la demande). Aucune donnée n' est présenté permettant de justifier une généralisation à toutes les possibilités des revendications.

**Ad point VII**

**Certaines irrégularités relevées dans la demande**

4.2 Le document D4 n'a pas été cité dans la demande

**Ad point VIII**

**Certaines observations relatives à la demande**

4.3 Il ressort clairement des exemples que la combinaison de squalène et Tween 80 et Span 85 dans les quantités spécifiées dans le tableaux 1 et 2 sont essentielles pour la réalisation de l'invention. Les revendications 1-14 ne contenants pas ces caractéristiques ne sont pas considérées claires car elles ne ne contiennent pas toutes les caractéristiques essentielles à l'invention.

4.4 La revendication 1 ne satisfait pas à l'exigence de clarté, car l'objet de la protection demandée n'est pas clairement défini: "pour l' utilisation dans la préparation d'une émulsion huile dans l'eau ayant un diamètre moyen de particule d'huile inférieur à 250". La revendication tente de définir l'objet par le résultat recherché, ce qui revient simplement à énoncer le problème sous-jacent, sans indiquer les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat.