

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle

Bureau international



(43) Date de la publication internationale
17 juin 2010 (17.06.2010)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/067035 A1

PCT

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 9/113 (2006.01) B01F 17/44 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/052493

(22) Date de dépôt international :
11 décembre 2009 (11.12.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0806987 12 décembre 2008 (12.12.2008) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE [FR/FR]; 42 rue Paul Duez, F-59800 Lille (FR). UNIVERSITE PARIS DESCARTES [FR/FR]; 12 rue de l'Ecole de Médecine, F-75270 Paris Cedex 06 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BROSSARD, Denis [FR/FR]; 9 impasse Beaulieu, F-92160 Antony (FR). CRAUSTE-MANCIET, Sylvie [FR/FR]; 29 boulevard Saint-Germain, F-75005 Paris (FR). MUHAMED, Saleh [IQ/FR]; 1 avenue du Colonel Fabien, F-93200 Saint-denis (FR). ODOU, Pascal

[FR/FR]; 65 rue Henri Baillieu, F-59270 Godewaersvelde (FR). BLANCO-PRIETO, Maria [ES/ES]; c/ Manuel Martinez de Ubago, 28, 3°B, E-31008 Pamplona (ES). ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA, Ander [ES/ES]; Avenida Pio XII 24, 2°H, E-31008 Pamplona (ES).

(74) Mandataire : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES; 122 rue Edouard Vaillant, F-92593 Levallois-perret Cedex (FR).

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

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD FOR MAKING A FORMULATION AND USE THEREOF FOR ADMINISTERING POLAR DRUGS

(54) Titre : PROCEDE DE FABRICATION D'UNE FORMULATION ET UTILISATION POUR LA DELIVRANCE DE MEDICAMENTS POLAIRES

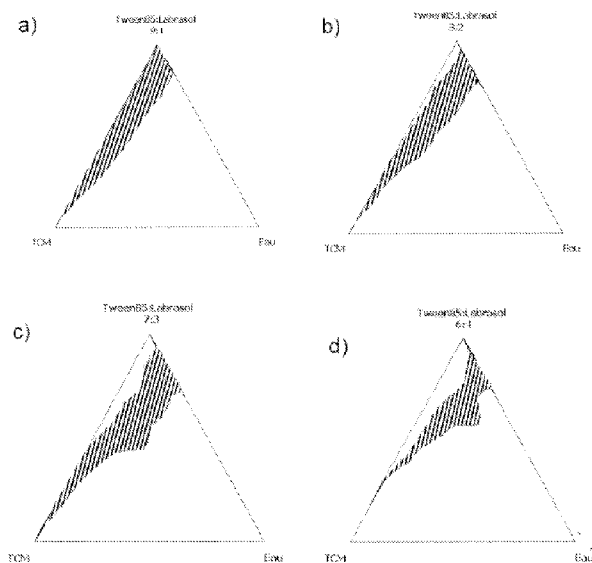


Figure 1

(57) Abstract : The present invention relates to a method for preparing a (H/L/H) multiple nanoemulsion in particular for the oral administration of polar molecules. The present invention also relates to a nanoemulsion that can be obtained by said method, to the use thereof for making a drug, and to a drug containing the nanoemulsion and an active agent. The method for preparing the nanoemulsion of the invention includes the following steps: (a) preparing a first aqueous solution; (b) mixing a non-ionic emulsifier, polyglycolysed glyceride and at least one triglyceride having fatty acid chains including 8 to 12 carbon atoms, wherein the non-ionic emulsifier/polyglycolysed glyceride ratio is 9/1 to 6/4; (c) forming a hydrophilic/lipophilic emulsion by adding the first aqueous solution obtained during step (a) to the mixture obtained during step (b); and (d) forming the pharmaceutical formulation by adding the emulsion obtained during step (c) in a second aqueous solution. The present invention can be used in the pharmaceutical and/or cosmetic fields.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]



WO 2010/067035 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h)

Publiée :

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

La présente invention se rapporte à un procédé de préparation d'une nanoémulsion multiples (H/L/H) notamment pour l'administration orale de molécules polaires. La présente invention se rapporte également à une nanoémulsion susceptible d'être obtenue par le procédé, à son utilisation pour la fabrication d'un médicament, ainsi qu'à un médicament comprenant la nanoémulsion et une substance active. Le procédé de préparation d'une nanoémulsion selon l'invention comprend les étapes suivantes (a) préparation d'une première solution aqueuse, (b) mélange d'un émulsifiant non ionique, de glycéride polyglycolysé et d'au moins un triglycéride dont les chaînes d'acide gras comprennent entre 8 et 12 atomes de carbone, dans lequel le ratio émulsifiant non ionique /glycéride polyglycolysé est compris entre 9/1 et 6/4, (c) formation d'une émulsion hydrophile/lipophile (H/L) par ajout de la première solution aqueuse obtenue à l'étape (a) dans le mélange obtenu à l'étape (b), et (d) formation de la formulation pharmaceutique par ajout de l'émulsion obtenue à l'étape (c) dans une seconde solution aqueuse. La présente invention trouve une application dans le domaine pharmaceutique et/ou cosmétique.

PROCÉDÉ DE FABRICATION D'UNE FORMULATION ET UTILISATION POUR LA DELIVRANCE DE MEDICAMENTS POLAIRES

5 **Domaine technique**

La présente invention se rapporte à un procédé de préparation d'une nanoémulsion notamment pour l'administration orale de molécules polaires.

10 La présente invention se rapporte également à une nanoémulsion susceptible d'être obtenue par le procédé, à son utilisation pour la fabrication d'un médicament, ainsi qu'à un médicament comprenant la nanoémulsion et une substance active.

La présente invention trouve une application dans le domaine pharmaceutique et/ou cosmétique.

15 Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([]) renvoient à la liste des références présentées à la fin du texte.

Etat de la technique

20 Durant les dernières décennies, des recherches ont porté sur l'absorption orale de médicaments faiblement solubles dans l'eau en utilisant des formulations à base de lipides et en particulier des émulsions de type huile dans l'eau (L/H) (Palin et al, (1986) *The oral absorption of cefoxitin from oil and emulsion vehicles in rats*. Int J Pharm 33:99-104 [1] ; Kararli et al, (1992) *Oral delivery of a renin inhibitor compound using emulsion formulations*. Pharm Res 9 : 888-893 [2] ; Myers et al. (1992) *Systemic bioavailability of penclomedine (NCS-33872) from oil-in-water emulsions administered intraduodenally to rats*. Int J Pharm 78 : 217-226 [3]).

30 Plus récemment, des systèmes de délivrance de médicaments auto-émulsionnables (« Self-Emulsifying Drug Delivery Systems » ou SEDDS) ont été mis au point (Pouton (1997) *Formulation of self-*

emulsifying drug delivery systems (SEDDS). Adv Drug Del Rev 25 : 47-48 [4]; Gursoy et Benita (2004) *Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs*. Biomed Pharmacother 58 : 173-182 [5]; Hong et al, (2006) *A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption*. J Control Release 110 : 332-338 [6]).

Malheureusement, ces recherches n'ont pas permis de fournir des formulations satisfaisantes pour l'absorption de molécules polaires administrées par voie orale.

D'autres recherches ont porté sur l'utilisation d'émulsion de type eau dans l'huile (H/L) pour administration orale de médicaments polaires (Constantinides et al, (1994) *Water-in-oil microémulsion incorporating medium-chain glycerides: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation in the rats*. Pharm Res 11 : 1385-1390 [7] ; Constantinides (1995) *Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects*. Pharm Res, 12(11): 1561-1572 [8]) ou de protéines (Cheng et al, (2008) *Characterization of water-in-oil microemulsion for oral delivery of earthworm fibrinolytic enzyme*. J Control Release 129:41-48 [9]). Cependant, le taux d'absorption d'émulsions administrées par voie orale est nettement inférieur au taux d'absorption d'émulsions administrées par voie intraveineuse.

Par ailleurs, il a été démontré in vitro que des émulsions multiples hydrophile/lipophile/hydrophile (H/L/H) sont utilisables pour protéger l'insuline (molécule polaire) lorsque celle-ci est associée à un inhibiteur de protéase (Silva-Cunha et al, (1997) *W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: preparation, characterisation and determination of stability towards proteases in vitro*. Int J Pharm 158 : 79-89 [10]). Par ailleurs, les émulsions L/H peuvent protéger les molécules polaires des attaques enzymatiques

(Crauste-Manciet et al, (1998) *Cefpodoxime proxetil hydrolysis protection by o/w submicron emulsions*. Int J Pharm 165 : 97-106 [11]).

De manière générale, les formulations sous formes d'émulsion ont prouvé leur aptitude à promouvoir l'absorption de composés hydrophobes (Nicolaos et al, (2003) *Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil-in-water submicron emulsion*. Int J Pharm 263(1-2) : 165-171 [12] ; Singh et Vingkar, (2008) *Formulation, antimalaria activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of pimaquine*. Int J Pharm 347 : 136-143 [13], Vyas et al, (2008) *Improved oral bioavailability and brain transport of saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations*. Int J Pharm 347 : 93-101 [14]) via le mécanisme de la lipolyse (MacGregor et al, (1997) *Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract*. Adv Drug Del Rev 25 : 33-46 [15]) et via le système lymphatique (O'Driscoll, (2002) *Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery*. Eur J Pharm Sci 15 : 405-415 [16]).

À titre d'exemple, la gentamicine est reconnue comme médicament non absorbé par voie orale. La gentamicine est un médicament hautement hydrophile polaire communément classés BCS III (haute solubilité – faible perméabilité) selon le modèle prédictif d'absorption orale d'Amidon (Amidon et al, (1995) *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability*. Pharm Res. 12 : 413-420 [17]). C'est est un antibiotique majeur utilisé pour le traitement d'une grande variété d'infections par des bacilles gram-négatifs et des cocci gram-positif (Fantin et al, (1991) *Factors affecting duration of in-vivo postantibiotic effect for aminoglycosides against gram-negative bacilli*. J Antimicrob Chemother 27 : 829-836 [18] ; Drabu et Blakemor, (1990) *Comparative post-antibiotic effect of five antibiotics against ten aerobic gram-positive cocci*. Drug Exp Clin Res 16 : 557-563 [19]). Sa faible absorption par la membrane intestinale peut être expliquée par son log P (octanol/eau) de -1,9 et son poids moléculaire élevé (449-478 g/mol) (Artursson et al, (1993) *Selective*

paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. Pharm Res 10 : 1123-1129 [20]). Sur des modèles des cellules épithéliales, la gentamicine ne peut pas diffuser par voie transcellulaire ou paracellulaire, en raison de sa charge positive et à son haut poids moléculaire (Ranaldi et al, (1992) *Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents.* Antimicrob Agents Chemother 36 : 1374-1381 [21]).

Les glycoprotéines-P sont des pompes ATP dépendantes présentes au niveau de la membrane intestinale qui limitent l'accumulation de certaines drogues ou médicaments dans l'organisme. Les antibiotiques de la classe des aminosides sont connus pour être des substrats aux glycoprotéines-P (pompe ATP dépendante (Banerjee et al, (2000) *Bioavailability of tobramycin after oral delivery in FVB mice using CRL-1605 copolymer, an inhibitor of P-glycoprotein.* Life Sci 67 : 2011-2016 [22]). Il en va de même pour la gentamicine (Hu et al, (2001) *A novel emulsifier, Labrasol enhance gastrointestinal absorption of gentamicin.* Life Sci 69 : 2899-2910 [23] ; Axelrod et al, (1998) *Intestinal transport of gentamicin with a novel, glycosteroid drug transport agent.* Pharm Res 15 : 1876-1881 [24]). Ces glycoprotéines-P font obstacles à l'accumulation d'antibiotiques aminosides dans les cellules en les rejetant. Ainsi, lorsque les aminosides sont administrés par voie orale et arrivent dans le tube digestif, leur absorption par l'organisme est limitée.

Il n'existe pas actuellement de formulation orale permettant l'absorption efficace d'une molécule polaire, par exemple des aminosides.

Une telle formulation serait pourtant très utile, par exemple dans le traitement de certaines endocardites qui nécessitent à ce jour une prise en charge par perfusion pendant 15 jours (Horstkotte et al, (2004) *Guideline on prevention, Diagnosis and treatment of infective endocarditis executive summary: The task force on infective endocarditis of the*

European Society of cardiology. European Heart journal 25(3) : 267-276 [25]).

Il existe donc un réel besoin de formulations palliant ces défauts, inconvénients et obstacles de l'art antérieur, notamment de fournir des formulations administrables par voie orale dont l'absorption est comparable à une absorption des formulations administrées par voie intraveineuse, y compris pour des molécules polaires.

Description de l'invention

La présente invention a précisément pour but de résoudre l'ensemble des problèmes précités, notamment en fournissant un procédé de fabrication d'une nanoémulsion.

Le procédé de la présente invention comprend les étapes suivantes :

- (a) préparation d'une première solution aqueuse,
- (b) mélange d'un émulsifiant non ionique, de glycéride polyglycolysé et d'au moins un triglycéride à moyennes chaînes, dans lequel le ratio émulsifiant non ionique/glycéride polyglycolysé est compris entre 9/1 et 6/4,
- (c) formation d'une émulsion hydrophile/lipophile initiale par ajout de la première solution aqueuse obtenue à l'étape (a) dans le mélange obtenu à l'étape (b), et
- (d) formation d'une nanoémulsion multiple hydrophile/lipophile/hydrophile (H/L/H) finale par ajout de l'émulsion obtenue à l'étape (c) dans une seconde solution aqueuse.

On entend par « émulsion » tout mélange homogène de deux substances liquides non miscibles. Une des deux substances est dispersée sous forme de globules dans la deuxième substance.

Une émulsion hydrophile/lipophile (H/L ou « hydrophile dans lipophile », anciennement appelée « eau dans l'huile ») est un mélange hétérogène d'une phase liquide hydrophile sous forme de globules dans une phase liquide lipophile. À l'instar, une émulsion lipophile/hydrophile (L/H ou « lipophile dans hydrophile », anciennement appelée « huile dans l'eau ») est un mélange hétérogène d'une phase liquide lipophile sous forme de globules dans une phase liquide hydrophile.

Une substance hydrophile est par définition non hydrophobe. Une substance lipophile par définition une substance hydrophobe.

Une « émulsion simple » est, une forme galénique composée deux phases non miscibles. Elle est de type H/L ou L/H.

On entend par « émulsion multiple », une émulsion comprenant trois phases, par exemple une émulsion de type H/L/H ou L/H/L.

Dans une émulsion simple, un « globule » est constitué d'une seule phase.

Dans une émulsion multiple, un « globule » est constitué de deux phases. La phase interne d'un globule d'une émulsion multiple est appelée un « cœur ».

On entend par « nanoémulsion », une émulsion dont la taille des globules est dans l'échelle nanométrique, c'est-à-dire inférieur à 1 μ m de diamètre.

On entend par « microémulsion », une nanoémulsion particulière isotropique dont la taille des globules est inférieure à 200 nanomètres et dont l'aspect est transparent.

On entend par « nanoémulsion de la présente invention » ou « nanoémulsion multiple (H/L/H) de la présente invention », la nanoémulsion susceptible d'être obtenue par le procédé de la présente invention.

On entend par « solution aqueuse » une solution hydrophile. Cette substance peut par exemple être de l'eau distillée, de l'eau minérale ou de l'eau dans laquelle une substance a été solubilisée. La solution aqueuse

peut par exemple être une solution saline. La solution aqueuse contient, par exemple, une substance polaire, par exemple, un antibiotique polaire, par exemple un antibiotique de la classe des aminosides, par exemple de la classe des glycopeptides, par exemple une séquence nucléotidique, par exemple une séquence protidique, par exemple une séquence peptidique.

L' « émulsifiant non ionique » est par exemple un ester de sorbitanne polyhydroxyéthylé, par exemple un ester de sorbitanne polyhydroxyéthylé comprenant 20 à 85 molécules d'oxyde d'éthylène, par exemple comprenant 85 molécules d'oxyde d'éthylène. Par exemple, l'émulsifiant non ionique utilisé dans le procédé de la présente invention est du trioléate de sorbitanne polyéthylène glycol, également appelé Polysorbate 85 ou Tween 85.

Le surfactant non ionique Polysorbate 85 est un excipient non toxique pour administration orale. La capacité au Polysorbate 85 à fournir des microémulsions H/L avec des propriétés d'émulsification spontanée en combinaison avec des TCM pour un ratio Polysorbate 85/TCM compris entre 30 et 45% est décrite dans le document Pouton et al, (1985) *Self-emulsifying drug delivery systems: assessment of the efficiency of emulsification*. Int J Pharm 27 : 335-348 [26].

Le « glycéride polyglycolysé » est par exemple choisi dans le groupe comprenant un mono-, di- et triesters de glycérol, de polyéthylène glycol avec des acides gras dont les chaînes comprennent entre 8 et 10 atomes de carbone. Par exemple, glycéride polyglycolysé est du caprylcaproxyl macrogo-8 glycéride, également appelé Labrasol®.

On entend par « moyennes chaînes » des acides gras dont le nombre de carbone peut être compris entre 8 et 12, par exemple entre 8 et 10 atomes de carbone.

L' « au moins un triglycéride à moyennes chaînes » (ou TCM) peut être par exemple un triglycéride caprylique, un triglycéride caprique ou un mélange de ceux-ci.

L'au moins un TCM a la capacité de former des phases L_2 (zones représentée sur un diagramme de phase pseudo-ternaire où l'on trouve des microémulsions H/L – voir exemple 1) de manière spontanée à température ambiante, et procurer bénéfice en termes d'amélioration de l'absorption intestinale ([7]; Constantinides et al, (1995) *Enhanced intestinal absorption of an GRD peptide from water-in-oil microemulsions of different composition and particle size*. *J control release* 34 : 109-116 [27]; Constantinides et al, (1996) *Water-in-oil microemulsions containing medium-chain fatty acids / salts: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation*. *Pharm Res* 13 : 210-215 [28]).

Dans le procédé de la présente invention, le ratio d'émulsifiant non ionique/glycéride polyglycolysé peut être par exemple de 7/3.

À l'étape (b) du procédé de la présente invention, le mélange d'émulsifiant non ionique et de glycéride polyglycolysé peut être mélangé par exemple avec au moins un TCM. Par exemple, le mélange peut être effectué avec un ratio (émulsifiant non ionique/glycéride polyglycolysé)/TCM compris entre 0/10 et 10/0, par exemple le ratio est compris entre 2/8 et 6/4, par exemple entre 4/6 et 5/4.

À l'étape (c) du procédé de la présente invention, la première solution aqueuse peut être ajoutée dans le mélange obtenu à l'étape (b) par exemple avec un ratio [(émulsifiant non ionique/glycéride polyglycolysé)/TCM]/eau compris entre 9/1 et 1/1, par exemple 8/2 ou 6/4, formant ainsi une émulsion simple de type H/L. Ces valeurs permettent avantageusement d'incorporer une quantité suffisante de substance active dans la nanoémulsion finale. Par exemple, la proportion d'eau dans la phase interne de l'émulsion H/L initiale de la présente invention peut être par exemple de 10%.

La classe des nanoémulsions a été définie par Porras et al. (Porras et al, (2008) *Properties of water-in-oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-energy emulsification method*. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 324 : 181-188 [29]) comme étant transparentes ou

translucides avec des tailles de particules comprises entre 50nm et 200nm, ou laiteuse avec des tailles de globules allant jusqu'à 500 nm. Porras et al. ([29]) ont réalisé des nanoémulsions H/L dont les globules atteignent des tailles comprises entre 30nm et 100nm.

5 L'émulsion H/L obtenue à l'étape (c) du procédé de la présente invention possède les propriétés des microémulsions H/L auto-émulsionnables. La taille des globules dans le procédé de l'invention est généralement inférieure à 200nm, par exemple inférieur à 10nm.

10 L'étape (d) du procédé de la présente invention est contrôlée *in vitro* avant administration conduisant à la formulation d'une nanoémulsion triple (H/L/H) caractérisable. Le contrôle de cette étape se distingue des systèmes émulsionnables spontanément qui sont décrits dans l'art antérieur, pour lesquels cette étape est réalisée spontanément *in vivo* conduisant en toute probabilité à des variabilités interindividuelles
15 d'absorption.

Par ailleurs, le procédé de la présente invention ne nécessite pas l'utilisation de phases solvants soit dans la formule finale, soit lors d'une phase intermédiaire de production (absence d'alcool, absence de DMSO...).

20 Dans le procédé de la présente invention, la nanoémulsion de l'étape (d) est obtenue par incorporation de l'émulsion de l'étape (c) dans la seconde solution aqueuse. Le ratio émulsion/seconde solution aqueuse peut être, par exemple, compris entre 1/1 et 1/10, par exemple entre 1/1 et 1/4, par exemple 1/2.

25 La présente invention se rapporte également à une nanoémulsion multiple H/LH susceptible d'être obtenue par le procédé de l'invention.

Une autre des originalités de la présente invention est que, de manière inattendue, la nanoémulsion de l'étape (d) présente des globules de taille nanométrique (environ 150 nm) avec un système à phase multiple.
30 Le diamètre moyen des globules de la nanoémulsion de la présente invention est très inférieur à celui des globules des émulsions multiples

classiquement développées dans l'art antérieur dont le diamètre des globules est de l'ordre du micromètre (Okochi et Nakano, (2000) *Preparation and evaluation of w/o/w type emulsions containing vancomycin*. Adv Drug Del Rev 45 : 5-26 [30] ; Cournarie et al, (2004) *Insulin-loaded w/o/w multiple: comparison of performances of systems prepared with medium-chain-triglycerides and fish oil*. Eur J Pharm Biopharm 58 : 477-482 [31] ; Bonnet et al, (2009) *Release rate profiles of magnesium from multiple w/o/w emulsions*. Food Hydrocolloids 23 : 92-101 [32]).

L'avantage procuré par la très petite taille des globules obtenus grâce au procédé de la présente invention est d'améliorer la stabilité thermodynamique de l'émulsion ([29]) et de rendre son absorption orale plus efficace en comparaison aux émulsions grossières ([12]).

À titre d'exemple, la nanoémulsion de la présente invention comprend en pourcentage en poids par rapport à la nanoémulsion :

- entre 2 et 35 % d'émulsifiant non ionique, par exemple entre 5 et 20%, par exemple entre 10 et 15 %, par exemple 11,67%,

- entre 1 % et 30 % de glycéride polyglycolysé, par exemple entre 1 et 10 %, par exemple 5 %,

- entre 2 et 50 % d'au moins un triglycéride dont les chaînes d'acide gras comprennent entre 8 et 12 atomes de carbone, par exemple entre 5 et 20%, par exemple entre 10 et 15 %, par exemple 13,33 %

- entre 1 et 95 % de solutions aqueuses, par exemple entre 50 et 90 %, par exemple entre 65 et 75 %, par exemple 70 %.

La nanoémulsion de l'invention combine des caractéristiques qui ne se retrouvent jamais combinées dans un seul système : phase multiple, taille des globules de l'ordre du nanomètre et procédé d'émulsification à basse énergie.

La nanoémulsion de la présente invention a été appelée « Multiple Self Emulsifying Nanoemulsion for Polar Drug Delivery » (MSEN-PDD®).

Le procédé de la présente invention peut en outre comprendre une étape de solubilisation d'une substance active dans la première solution aqueuse obtenue à l'étape (a).

5 La substance active peut être par exemple une molécule polaire, par exemple une molécule hydrophile. Par exemple, la substance active peut être choisie dans le groupe comprenant les aminosides, par exemple la gentamicine, l'amikacine, la kanamycine, la néomycine, la nétilmicine, la paromomycine, la streptomycine, la tobramycine, etc. ; les antiviraux, par
10 exemple l'abacavir, la didanosine, la lamivudine, la ribavirine, la stavudine, la valacyclovir, etc. ; les anticancéreux, par exemple le méthotrexate, le tégafur, la capécitabine, etc. ; les antalgiques, par exemple la codéine, la morphine, etc. ; les vitamines, par exemple la pyridoxine, la riboflavine, etc. ; les antépiléptiques, par exemple la gabapentine, le topiramate, etc. ;
15 les peptides, par exemple la méthionine, les analogues de la LH-RH, etc. ; les protéines, par exemple l'insuline, l'héparine, les anticorps monoclonaux, etc. ; les oligonucléotides, par exemple l'ADN, l'ARN, etc. ; d'autres molécules, par exemple l'acide alendronique, le chloramphénicol, la méthyldopa, l'atropine, le lévétiracétam, etc. ; ou être un mélange de ces
20 substances. Le mélange de ces substances peut être un mélange de deux ou plusieurs des antibiotiques précités.

Selon le procédé de la présente invention, la première et la seconde solution aqueuse peuvent être identiques ou différentes. Elles peuvent être choisies indépendamment dans le groupe comprenant de l'eau, par
25 exemple une solution de glycérol, par exemple une solution d'acide chlorhydrique, par exemple une solution de soude ou une solution saline : par exemple une solution de chlorure de sodium, par exemple une solution de ringer, par exemple une solution de ringer-lactate, par exemple une solution de phosphates mono ou di sodiques, par exemple une solution
30 acétate ou par exemple tout autre solution tampon, ou un mélange de ces solutions.

Dans le procédé de la présente invention, les étapes (a) à (d) peuvent être réalisées à toute température appropriée permettant l'obtention d'une nanoémulsion selon l'invention. L'homme du métier pourra aisément adapter la température suivant ses besoins. Généralement, la température de mise en œuvre du procédé de l'invention peut être comprise entre 10°C et 40°C, par exemple entre 15°C et 30 °C, par exemple entre 15°C et 25°C.

Dans un aspect de l'invention, le procédé de la présente invention peut comprendre en outre une étape d'incorporation d'un ou plusieurs polymères tel que défini par Hanson et al. (Hanson et al, (2008) *Nanoscale double emulsion stabilized by single-component block copolypeptides*. Nature 455 : 85-88 [33]).

Une des nombreuses originalités de la présente invention réside dans le fait que chacune de ces étapes suit un procédé spontané d'émulsification, c'est-à-dire un procédé à basse énergie. Le procédé de la présente invention est très facile à mettre en œuvre. Il ne nécessite pas d'agitation poussée, de passage par émulsification sur membrane, de hautes pressions, chaleur, de traitement ultrason ou d'évaporation de solvant, comme dans les procédés de l'art antérieur.

Dans le procédé de l'invention, le mélange de l'étape (b) peut être réalisé par exemple par simple agitation, par exemple au moyen d'un barreau aimanté, un plateau mobile, au moyen de bulles de gaz, au moyen de pales, au moyen d'une rotation ou d'un balancement du contenant.

Un des avantages du procédé de l'invention à basse énergie est qu'il permet l'inclusion de molécules polaires sensibles aux contraintes précitées. En outre, les molécules (ou substances actives) incorporées dans la nanoémulsion de la présente invention ne sont pas dénaturées.

Dans le procédé de la présente invention, l'étape (d) peut être réalisée de manière extemporanée.

La présente invention se rapporte également à l'utilisation de la nanoémulsion multiple H/L/H susceptible d'être obtenue par le procédé de la présente invention, pour la fabrication d'un médicament.

5 La présente invention se rapporte également à un médicament comprenant la nanoémulsion multiple H/L/H de la présente invention et une substance active.

La substance active est déjà définie ci-dessus.

Par exemple, la nanoémulsion de la présente invention permet avantageusement l'absorption par voie orale de principes actifs jusqu'alors
10 non absorbables par voie orale.

Par exemple, il n'existe à ce jour aucune forme commercialisée de gentamicine orale. De plus, les formes en développement n'ont pas permis d'obtenir un résultat aussi important que celui obtenu par la présente formulation (10% de biodisponibilité absolue chez le chien après
15 administration orale). (Ito et al, (2005) *Oral solid gentamicin preparation using emulsifier and adsorbent*. J Control Release 105 : 23–31 [34]).

Par exemple, l'administration orale de principes actifs nucléotidiques via la nanoémulsion multiple susceptible d'être obtenue par le procédé de la présente invention offre une nouvelle alternative comme vecteur de
20 gène non-viral pour la thérapie génique.

La nanoémulsion multiple H/L/H de la présente invention combine en outre les propriétés suivantes permettant d'améliorer l'absorption orale de médicaments :

- 25 a) L'utilisation d'un véhicule à base de lipides qui modifie la voie d'absorption de médicament utilisant le transport lipolytique et/ou lymphatique,
- b) L'inclusion de molécules hydrophiles polaires dans le cœur de systèmes lipidiques par la réalisation d'une émulsion
30 multiple dans le but de protéger la substance active des

attaques enzymatiques ou des interactions avec la glycoprotéine-P du système circulatoire.

5 c) Réalisation d'un haut niveau de dispersion avec des tailles de globules de l'ordre du nanomètre qui sert à l'absorption intestinale, et

d) L'inclusion dans la formulation d'un améliorateur d'absorption de la gentamicine connu (capryl caproyl macrogol-8 glycéride).

10 D'autres avantages pourront encore apparaître à l'homme du métier à la lecture des exemples ci-dessous, illustrés par les figures annexées, présentés à titre illustratif.

Brève description des figures

15

□ La figure 1 représente des diagrammes de phase pseudo-ternaire de Polysorbate 85/Labrasol®, de triglycéride dont les chaînes d'acide gras comprennent entre 8 et 12 atomes de carbone et d'eau, pour différents ratios de Polysorbate 85/Labrasol® : a) 9/1, b) 8/2, c) 7/3 et d) 6/4. La phase L₂ est représentée par une zone hachurée.

20

□ La figure 2 représente la distribution des tailles des globules dans l'émulsion H/L initiale A, B et C. En abscisse est représenté le diamètre (d) des globules (nm), en ordonnée leur proportion (P) en pourcentage.

25

□ La figure 3 représente des photomicrographies par microscopie électronique des émulsions initiale H/L A, B et C contenant 3% d'acide phosphotungstique dans la phase aqueuse (grossissement x 10 000).

□ La figure 4 représente la distribution des tailles des globules dans la nanoémulsion A, B et C de la présente invention H/L/H fraîchement

préparée. En abscisse est représenté le diamètre (d) des globules (nm), en ordonnée leur proportion (P) en pourcentage.

□ La figure 5 représente la distribution des tailles des globules dans la nanoémulsion A, B et C de la présente invention H/L/H après 10 minutes d'émulsification. En abscisse est représenté le diamètre (d) des globules (nm), en ordonnée leur proportion (P) en pourcentage.

□ La figure 6 représente l'évolution de la distribution de la taille des globules, diamètre moyen (a) et diamètre maximum (b) de la nanoémulsion de la présente invention. En abscisse est représenté le temps (t) en minutes, en ordonnée le diamètre (dm : diamètre moyen, dmax : diamètre maximum) des globules (nm).

□ La figure 7 représente des photomicrographies par microscopie électronique des nanoémulsions de la présente invention H/L/H A, B et C contenant 4% d'acétate d'uranyle (grossissement x 20 000).

□ La figure 8 représente le modèle exact de Loo-Riegelman. C représente la concentration dans le compartiment central, V_c est le volume de distribution dans le compartiment central, et k_{10} , k_{12} et k_{21} sont des constantes de vitesse de transfert. E représente l'absorption (ou Input), A représente la quantité dans le compartiment central.

□ La figure 9 représente la concentration moyenne de gentamicine dans le plasma après administration par voie intraveineuse. En abscisse est représenté le temps (t) en heures, en ordonnée la concentration (C) en gentamicine ($\mu\text{g/ml}$).

□ La figure 10 représente la concentration moyenne de gentamicine dans le plasma après administration par voie orale. En abscisse est représenté le temps (t) en heure, en ordonnée la concentration (C) en gentamicine ($\mu\text{g/ml}$).

□ La figure 11 représente la quantité moyenne absorbée, de gentamicine dans le plasma après administration par orale. En abscisse est représenté le temps (t) en heures, en ordonnée la quantité absorbée (Qa) de gentamicine (% de la dose administrée).

□ La figure 12 représente le profil de vitesse d'absorption de la gentamicine en fonction du temps. En abscisse est représenté le temps (t) en heures, en ordonnée la vitesse d'absorption (V_a) de la gentamicine ($\mu\text{g/h}$).

5

EXEMPLES

Matériel

10 Dans les exemples qui suivent, la poudre de sulfate de gentamicine provient de Schering Plough (Herouville St Clair, France). Le polysorbate 85 (Tween 85V) provient de QUISMASSO (Lyon, France). Le capryl caproyl macrogol-8-glycérade (Labrasol®) provient de Gattefossé (Saint Priest, France). Les triglycérides à chaîne moyenne (TCM) proviennent de SIO (Saint Laurent Blangy, France). Les autres réactifs utilisés se trouvent en pharmacie.

15 Pour la quantification de la gentamicine : le méthanol, l'acide trichloracétique provient de chez Panreac (Barcelone, Espagne). L'acide pentafluoropropionique (PFPA) provient de chez Chemie (Buchs, Suisse), la Tobramycine de Normon (Madrid, Espagne). Les autres réactifs utilisés se trouvent en pharmacie.

20

Exemple 1 : Recherche des concentrations des composés pour la préparation de la nanoémulsion

25 1.1 Diagramme de phase pseudo-ternaire

Afin d'obtenir l'émulsion H/L initiale, l'établissement d'un diagramme de phase pseudo-ternaire a été utilisé pour déterminer les zones où une microémulsion H/L (ou phase L_2) est présente suivant le protocole décrit dans le document Constantinides, 1995 ([8]).

30

Des diagrammes de phases pseudo-ternaires ont donc été établis pour déterminer la zone isotrope et limpide de nanoémulsions H/L. Les

inventeurs ont par ailleurs étudié la capacité d'inclure différentes quantités de Caprylo caproyl macrogol-8-glycéride (Labrasol®) 15, 20 et 30%.

L'état physique des émulsions testées est représenté sur un diagramme de phases pseudo-ternaire par le programme d'ordinateur ProSim® (ProSim, Labège, France). Ce diagramme est composé de trois axes représentant une phase aqueuse, une phase huileuse et une phase constituée d'un mélange de surfactants et de co-surfactant à des ratios fixes.

Les diagrammes de phase pseudo-ternaire ont été construits suivant une méthode de titration pour une formulation d'une microémulsion initiale H/L dans un système comprenant quatre composés : un triglycéride d'acide gras dont la chaîne comprend entre 8 et 12 atomes de carbone, un surfactant : le Polysorbate 85 (HLB=11), un co-surfactant : le Labrasol® (Balance Hydrophile-Lipophile ou HLB =14) et de l'eau distillée.

Le surfactant et le co-surfactant ont été mélangés à différents ratios (poids/poids) : 9/1, 8/2, 7/3, 6/4. Un diagramme de phase pseudo-ternaire a été établi pour chacun de ces ratios.

La réalisation de ces mélanges est précisée dans l'exemple 3.

Pour chaque diagramme de phase, différentes combinaisons de ratios (poids/poids) de (Polysorbate 85/Labrasol)/TCM ont été réalisés : 10/0, 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7, 2/8, 1/9, 0/10.

Une titration lente avec une phase aqueuse, et contrôlée avec un bain thermostaté à 25°C, a été réalisée pour chacun des ratios de (Polysorbate 85/Labrasol)/TCM et une observation des nanoémulsions H/L a été réalisée. Celles-ci peuvent être observées comme étant transparentes et stables.

Une fois les formulations transparentes et stables obtenues, des tests de non-dispersabilité et de conductance ont été réalisés pour vérifier si les microémulsions formées sont de type H/L. Les tests de non dispersabilité ont montré une non dispersion dans l'eau, les tests de

conductance ont montré que le courant électrique entre les deux électrodes était nul.

De plus, les microémulsions ont été examinées sous une lumière polarisante. Ces microémulsions sont non-biréfringents comme le laissait
5 suspecter leur nature isotropique.

Les résultats des diagrammes de phase pseudo-ternaire sont présentés sur la figure 1. Quatre diagrammes de phase pseudo-ternaire ont été obtenus (avec des ratios de Tween 85/Labrasol® (a) 9/1, (b) 8/2, (c) 7/3 et (d) 6/4).

10 Le ratio de surfactant/co-surfactant de 7/3 présente de manière inattendue la plus grande surface de microémulsion (20,3 %) comparé aux 13,9 %, 16,3 % et 17,9 % des ratios respectifs de 6/4, 9/1 et 8/2.

1.2 Sélection des formulations

15 La sélection du meilleur système surfactant/co-surfactant a été faite en tenant compte de la plus grande surface de la phase L₂ sur les diagrammes de phases pseudo-ternaire, et de la capacité de ce système à intégrer potentiellement plus de 10% d'eau.

La turbidité a été mesurée pour sélectionner de manière optimale la microémulsion de type H/L. La turbidité des microémulsions résultantes est
20 donnée en unités de turbidité nephélométrique (UTN) et a été mesurée par un turbidimètre (HACH Model 2100AN, Loveland, U.S.A.) calibré avec des étalons internes de formazine.

Vingt-sept formulations du diagramme de phases pseudo-ternaire ont été réalisées.

25 La plus faible valeur de turbidité pour une composition TCM/Tween85/Labrasol®/Eau (40/35/15/10 poids/poids) a été obtenue pour un système où le ratio surfactant/co-surfactant était de 7/3.

Sur les vingt-sept formulations réalisées, trois formulations (A, B et C) ont été retenues.

Les compositions des formulations A, B et C sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Composition en pourcentage (poids/poids) de trois nanoémulsions H/L (A, B et C) chargées avec 5 mg/g de gentamicine

	A	B	C
Polysorbate 85	35	35	35
Labrasol®	15	20	25
TCM	40	35	30
Phase aqueuse	10	10	10

5

La meilleure des trois formulations est la formulation A (avec le ratio 7/3) choisie pour sa faible turbidité (1,19 UTN : Unité de Turbidité Néphélométrique). Les formulations avec le ratio 6/4 et 8/2 ont respectivement une turbidité de 2,41 NTU et 13 NTU.

10 Deux autres formulations (formulation B et C) ont été réalisées pour examiner l'effet d'une plus grande quantité de Labrasol®.

Exemple 2 : Caractérisation physique des systèmes d'émulsions initiales H/L et de nanoémulsions multiples H/L/H

15 2.1 Viscosité et index de réfraction

La viscosité des émulsions a été mesurée par un modèle de viscosimètre rotationnel de type Brookfield Rheoset (RV) contrôlé par un programme d'ordinateur et équipé avec un adaptateur de petits échantillons (Brookfield, Stoughton, U.S.A.). La viscosité de l'échantillon est donnée en cP. Pour mesurer l'index de réfraction, un réfractomètre (ATAGO, Japon) a été utilisé. Les instruments sont calibrés avec de l'eau déminéralisée. Les mesures sont réalisées à une température de 25°C contrôlée par un bain thermostaté Polystat 33 (Bioblock Scientific, Paris, France). Toutes les mesures ont été répétées trois fois.

20

Les trois formulations examinées montrent des valeurs de viscosité similaires de $140,94 \pm 0,45$, $135,16 \pm 1,72$ et $134,42 \pm 0,32$ (cP) respectivement pour les formulations A, B et C.

L'indice de réfraction était de 1,446 pour les trois formulations.

5 2.2 Observations macroscopiques

Toutes les émulsions initiales H/L ont été observées par transparence avant de réaliser l'émulsion multiple H/L/H finale.

L'aspect macroscopique (homogénéité) de l'émulsion multiple H/L/H finale a été évalué durant cinq jours.

10 Toutes les émulsions H/L initiales (A, B, C) sont homogènes et translucides.

Les émulsions multiples finales A, B et C obtenue sont des émulsions homogènes blanches stables.

15 2.3 Diamètres des globules au stade de l'émulsion initiale et à celui de la nanoémulsion finale

La taille des particules et l'index de polydispersité (IP) de la microémulsion H/L initiale et de la nanoémulsion H/L/H finale ont été mesurées par spectroscopie de corrélation de photon (PCS) à 25°C et à un angle de dispersion de 90°.

20 L'étude du procédé d'émulsification de la nanoémulsion multiple H/L/H a été mesurée pendant soixante minutes par analyse de la taille des globules, par diffraction laser à l'aide d'un Mastersizer (Malvern Instruments, Orsay, France). Pour cette analyse, chaque échantillon d'émulsion a été dilué avec de l'eau distillée (1/1000).

25 Toutes les mesures ont été répétées trois fois.

Le diamètre moyen des particules et l'index de polydispersité (IP) des trois formulations au stade de l'émulsion initiale H/L sont présentés sur dans le tableau 2 ci-dessous et sur la figure 2.

Tableau 2 : Analyse et taille des globules des émulsions H/L initiales A, B et C

	A	B	C
Diamètre moyen (nm)	4,57 ± 0,17	5,44 ± 0,07	6,78 ± 0,11
IP	0,180 ± 0,024	0,176 ± 0,017	0,198 ± 0,027

Les mesures sont des moyennes ± écart type (n=3)

5 Les diamètres moyens des globules des trois formulations sont similaires et inférieurs à 10 nm. Leur index de polydispersité est inférieur à 0,2. La plus basse des valeurs est obtenue avec la formulation A.

10 Les trois formulations finales (nanoémulsion H/L/H) A et B ont montré des tailles de particule à échelle nanométrique avec une distribution Gaussienne étroite (Tableau 3, Figure 4, 5 et 6). La formulation C a montré une distribution polydispersée avec un indice de polydispersité supérieur 0,2 et un second pic supérieur 1 µm.

Tableau 3 : Analyse et taille des globules des nanoémulsions H/L/H finale A, B et C fraîchement préparées et 10 minutes après émulsification

<i>Émulsions fraîchement préparées</i>			
	A	B	C
Diamètre moyen (nm)	141,7 ± 1,1	156,3 ± 0,4	196,6 ± 1,5
IP	0,171 ± 0,014	0,183 ± 0,06	0,244 ± 0,006
<i>10 minutes après émulsification</i>			
Diamètre moyen (nm)	174,2 ± 1,1	282,9 ± 4,5	ND
IP	0,133 ± 0,008	0,183 ± 0,06	ND

Les mesures sont des moyennes ± écart type (n=3)

ND : Non déterminable

15

Pour les formulations A et B, au bout de dix minutes, un accroissement du diamètre moyen et de l'indice de polydispersité a été observé. Seule la formulation B montre un indice de polydispersité supérieur à 0,2. Cette évolution a été confirmée par la diffraction par laser (Figure 6). À 20 minutes après l'émulsification, la taille des globules croit et

20

les plus grands diamètres excèdent 1 μm . À 60 minutes, les diamètres moyens excèdent 1 μm . En parallèle, aucune évolution négative de la formulation A durant 60 minutes n'a été observée par diffraction par laser.

2.4 Potentiel zêta

5 Les mesures du potentiel zêta ont été réalisées avec un Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, Orsay, France).

La détermination du potentiel Zêta est basée sur la mobilité électrophorétique en milieu aqueux et a été mesuré par un Zetasizer nano ZS® Malvern Instruments, Orsay, France).

10 Pour les trois formulations A, B et C, les valeurs du potentiel ζ étaient respectivement de $-26,43 \pm 1,00$, $-27,13 \pm 0,50$ et $-23,87 \pm 0,06$ (mV).

Une légère différence entre les formulations a été observée lorsque les émulsions ont été chargées avec la gentamicine avec des valeurs de -
15 $13,26 \pm 1,0$, $-10,9 \pm 0,60$ et $-13,20 \pm 0,43$ pour les formulations A, B et C respectivement.

2.5 Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Une technique de préparation d'échantillons a été développée pour produire de petits échantillons qui sont perméables au faisceau d'électrons
20 permettant la MET. Un colorant négatif soluble dans l'eau a été utilisé. 3% d'acide phosphotungstique a été incorporé dans la phase aqueuse discontinue de la microémulsion H/L, et 4% d'acétate d'uranyle ont été incorporés dans les phases aqueuses externe et interne pour caractériser la nanoémulsion multiple H/L/H.

25 Des gouttes de 5 μL de cette dispersion ont été déposées entre lame et lamelle pour obtenir un film fin, une grille de cuivre recouverte d'une membrane de carbone (Formvar/carbon, Agar Scientific) a été appliquée sur un film fin afin d'obtenir une couche fine.

Pour la nanoémulsion multiple, une goutte de 5 μ L a directement été déposée sur une grille de cuivre suivie d'une application d'une goutte de 5 μ L de solution d'acétate d'uranyle à 2%.

5 Les analyses d'échantillons ont été réalisées par un Microscope Electronique à Transmission JEOL JEM-100S à 80 kV.

Les images obtenues par la MET pour les émulsions initiales H/L A, B et C (Figure 3) montrent une phase aqueuse interne, incluant de l'acide phosphotungstique, colorée négativement. La structure sphérique des globules reflète la nature H/L des microémulsions.

10 Les images de MET (Figure 7) des trois émulsions multiples (A, B, C) montrent des globules sphériques et réguliers. La structure en trois phases est confirmée par une observation de globules sombres à l'intérieur de plus grands globules d'eau.

15 **Exemple 3 : Incorporation de la gentamicine dans la nanoémulsion de la présente invention**

3.1 Préparation de la microémulsion H/L initiale incluant la gentamicine

La gentamicine a d'abord été dissoute dans l'eau à raison de 50 mg par millilitre d'eau formant ainsi une première solution aqueuse. L'eau peut
20 être remplacée par une solution aqueuse par exemple de solution de glycérol, par exemple de solution d'acide chlorhydrique, par exemple de solution de soude ou une solution saline : par exemple une solution de chlorure de sodium, par exemple une solution de ringer, par exemple une solution de ringer-lactate, par exemple une solution de phosphates mono
25 ou di sodiques, par exemple une solution acétate ou par exemple tout autre solution tampon. Le Polysorbate 85 et le Labrasol® sont ensuite mélangés. Ce mélange est ajouté à du TCM. Puis le mélange de Polysorbate85-Labrasol®-TCM est ajouté à la première solution aqueuse, formant ainsi une émulsion H/L initiale. Cette émulsion est identifiée en

tant que formulation isotropique transparente et claire. La composition de l'émulsion A est définie dans le tableau 1 (formule A), La composition finale est définie dans le tableau 4.

5 **3.2 Préparation de la nanoémulsion multiple H/L/H finale**

La formulation isotropique transparente et claire initiale est alors directement ajoutée dans de l'eau à un ratio émulsion (H/L initiale)/eau de 1/2, sous faible agitation manuelle.

10 La composition de l'émulsion et ses caractéristiques sont présentées respectivement dans les tableaux 4 et 5 ci-dessous.

Tableau 4 : Composition en gramme d'une nanoémulsion H/L/H chargée avec 500 mg de gentamicine

<i>Phase interne (microémulsion H/L)</i>	
Polysorbate 85	35
Labrasol®	15
TCM	40
Eau	10
<i>Phase externe</i>	
Eau q.s.p.	300

Tableau 5 : Caractéristiques de nanoémulsions multiples H/L/H chargée avec 500 mg de gentamicine ou non chargée

15

	Non chargée	Chargée
Diamètre moyen (nm)	156,7 ± 1,1	141,7 ± 1,1
IP	0,238 ± 0,005	0,171 ± 0,014
Potentiel Zeta	-26,4 ± 1,0	-13,2 ± 1,0

Les mesures sont des moyennes ± écart type (n=3)

Exemple 4 : Mesure de l'absorption par administration orale de la gentamicine par une formulation de la présente invention

20 La pharmacocinétique est l'étude de la distribution dans le temps d'une molécule, notamment un médicament, dans les différents compartiments du corps, ainsi que son absorption, sa distribution, son métabolisme et son excrétion.

L'étude pharmacocinétique de l'absorption orale de la gentamicine à partir de la nanoémulsion multiple (MSEN-PDD®) a été réalisée sur des rats adultes Wistar éveillés (Charles River, Saint Aubin Les Elbeuf) selon la méthode de Waeldele et Stoclet (Waeldele et Stoclet, (1973) *Permanent catheterization of the thoracic aorta. Direct measure of blood pressure, injection of substances, and blood sampling in the waking rat.* J Physiol 66 : 357-366 [35]). Leur poids moyen était de 267 ± 25 g.

Les expériences sur les animaux ont été accordées par un comité éthique local et enregistrées sous le numéro P2 CC 021 06.

L'étude a été réalisée sur cinq rats pour les solutions parentérales et sur cinq autres pour la nanoémulsion multiple orale.

Avant la chirurgie, une anesthésie a été réalisée par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (50mg/kg). Un cathéter en polyéthylène a été implanté de manière permanente dans l'aorte thoracique en passant par la carotide gauche. L'extrémité libre du cathéter a été externalisée à la base du cou et clampée avec une petite cheville en caoutchouc.

Du ketoprofene (10 mg/kg IM) a été injecté durant 20 minutes avant la fin de la chirurgie pour assurer l'analgésie.

Les échantillons de sang ont été prélevés via le cathéter. Avant et entre chaque prélèvement, le cathéter est nettoyé avec une solution de chlorure de sodium à 0,9% contenant de l'héparine sodique (200 UI/ml).

Les rats ont subi un jeûne de douze heures avant l'administration du médicament avec un accès libre à l'eau durant toute l'expérimentation.

La dose de gentamicine pour les formulations orales était de 5 mg/kg. La dose choisie pour les solutions parentérales était inférieure à la dose orale (1 mg/kg) en raison des risques d'insuffisance rénale qui peuvent être causées par des doses trop élevées de gentamicine (Barza et

al, (1975) *Predictability of blood levels of gentamicin in man*. J Infect Dis 132(2) : 165-174 [36]).

5 Durant chaque expérience, 0,2 ml de sang a été collecté via le cathéter et placé dans des tubes héparinés à 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, et 360 minutes après l'administration par intraveineuse et à 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 et 720 minutes après l'administration orale. Le plasma sanguin a été obtenu par centrifugation à 6000 rpm durant 15 minutes (Microcentrifugeuse Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) et stocké à -20°C jusqu'à l'analyse.

10 Les formulations orales et parentérales ont été fraîchement préparées avant leur administration, et ont été délivrées par une intubation orale par cathéter.

15 La méthode de quantification de la gentamicine a été adaptée à partir d'une méthode utilisant la spectrométrie de masse-HPLC (Lecaroz et al, (2006) *Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method*. J antimicrob Chemther 58(3) : 557-563 [37]). L'appareil utilisé pour l'analyse HPLC était un modèle 1100 Series LC couplé avec un spectromètre de masse à ionisation par électrospray à pression atmosphérique (HP 1100 avec MSD VL, Waldbronn, Allemagne). Un ordinateur Hewlett-Packard utilisant le logiciel ChemStation G2171 AA a été utilisé pour l'acquisition et l'analyse des données. La tobramycine a été choisie en tant qu'étalon interne.

25 La séparation a été réalisée à 20°C sur une colonne à phase inversée C8 (Lichrospher 60 RP, 250 mm x 4 mm) provenant de chez Merck (Darmstadt, Allemagne).

Le flux était de 0,5 ml/min.

L'ionisation a été réalisée en mode balayage de type « détection d'ions sélectionnés » (SIM). La valeur m/z des ions était de 478,30 pour la gentamicine et de 468,20 pour la tobramycine.

5 Le voltage du capillaire était de 4 kV et le voltage de fragmentation était de 70 V.

La température était de 350°C et le gaz de séchage (12L/min) et le gaz de nébulisation (50 PSI) étaient tous deux de l'azote.

10 La phase mobile était constituée d'un gradient linéaire d'acide pentafluoropropionique (PFPA, 20 mM dans de l'eau ultra pure) et du méthanol.

Pour la quantification chromatographique de la gentamicine, tous les échantillons de plasma ont été traités de la même manière.

15 10 μ L d'étalon interne ont été ajouté à 80 μ L de plasma, puis 10 μ L d'acide trichloroacétique à 2% ont été ajouté pour faire précipiter les protéines.

Le volume a été ajusté à 300 μ L par addition d'une solution de PFPA/méthanol à un ratio 1/1. Après centrifugation (2100 rpm, 10 min), 10 μ L de surnageant ont été injecté dans la colonne de HPLC. La quantité d'étalon tobramycine injectée a été maintenue constante.

20 Les paramètres pharmacocinétiques de la gentamicine ont été déterminés par analyse compartimentale.

25 Les paramètres suivant ont été calculés : constante de vitesse d'élimination (k_{el}), la demie-vie d'élimination ($T_{1/2el}$), Surface Sous la Courbe (SSC) de concentration sérique de gentamicine, clairance d'élimination (Cl).

Pour l'administration orale, les paramètres précités ont également été calculés, de même que la concentration maximale (C_{max}), temps

nécessaire pour atteindre C_{max} (T_{max}), constante de vitesse d'absorption (k_a).

La méthode de Loo-Riegelman a été utilisée pour déterminer les profils d'absorption selon le modèle suivant :

5
$$\frac{A(t)}{V_c} = C(t) + k_{10} \int_0^t C dt + k_{12} \cdot e^{k_{12} \cdot t} \int_0^t C e^{k_{21} \cdot t} dt \quad \text{equation 1}$$

$C(t)$ représente la concentration sérique après administration orale, V_c est le volume apparent de compartiment central, et k_{10} , k_{12} et k_{21} sont des constantes de vitesse de transfert (Figure 8).

10 Les données expérimentales sont intégrées dans l'équation suivante pour examiner les cinétiques d'absorption :

$$\frac{A(t)}{A_\infty} = k \cdot t^\alpha \quad \text{equation 2}$$

Le taux d'absorption dA/dt a été calculé entre les temps $n-1$ et $n+1$ à partir des quantité de médicament appropriées comme suit :

$$\frac{dA}{dt} = \frac{A_{n+1} - A_{n-1}}{t_{n+1} - t_{n-1}}$$

15 Les paramètres de courbes sont estimés par la méthode de régression non linéaire avec le programme XLSTAT (addinsoft).

Les concentrations moyennes de gentamicine dans le plasma par rapport au temps après administration par voie intraveineuse ou après administration orale sont respectivement représentées sur les figures 9 et 20 10.

Les meilleurs ajustements sont obtenus avec un modèle bi-compartimental après administration par voie intraveineuse, et mono-compartimental après administration voie orale. Les paramètres

pharmacocinétiques de la gentamicine après administration par voies intraveineuse et orale sont présentés dans les tableaux 6 et 7 ci-dessous.

Tableau 6 : Résultats pharmacocinétiques de la gentamicine administrée par intraveineuse dans des rats (n=5)

B (□g/ml)	5,07 ± 1,48
□ (l/h)	0,76 ± 0,40
A (□g/ml)	1,24 ± 0,84
□ (l/h)	5,10 ± 4,42
SSC (h.□g/ml)	3,33 ± 0,74
SSC _□ (h.□g/ml)	6,48 ± 2,26
Vd (ml/kg)	158,46 ± 39,40
TMS (h)	1,52 ± 0,91
T1/2 _□ (h)	0,14 ± 0,07

Les mesures sont des moyennes ± écart type

5

Tableau 7 : Résultats pharmacocinétiques de la gentamicine administrée une nanoémulsion MSEN-PDD® de la présente invention dans des rats (n=5)

C_{max} (□g/ml)	8,81 ± 3,31
T_{max} (h)	0,90 ± 0,42
□ (l/h)	0,29 ± 0,05
SSC (h.□g/ml)	26,55 ± 13,40
SSC _□ (h.□g/ml)	35,76 ± 15,35
TMS (h)	3,83 ± 0,56
T1/2 _□ (h)	2,43 ± 0,36

Les mesures sont des moyennes ± écart type

10 Pour la voie orale, la C_{max} était de 8,81 □g/ml ± 3,31 et le T_{max} était de 0,90 h ± 0,42.

L'analyse du profil de d'absorption de la gentamicine a été réalisée suivant la méthode de Loo-Riegelman. Les profils des taux d'absorption obtenus durant les six premières heures sont présentés dans les figures 11 et 12.

15

L'ajustement du profil d'absorption avec le modèle d'Higushi

$\left(\frac{A(t)}{A_{\infty}} = K \cdot t^{0,5}\right)$ n'est pas optimal ($r^2=0,915$). Par contre il suit le modèle

suivant : $\frac{A(t)}{A_{\infty}} = 50.2 \cdot t^{0,37}$ ($r^2=0,990$).

La biodisponibilité absolue a été estimée à $98,8 \pm 33,8\%$.

5 Les paramètres pharmacocinétiques de la gentamicine après administration par voie intraveineuse sont très similaires à ceux précédemment publiés chez les rats (Taniara et al, (1997) *Effect of endotoxin on gentamicin pharmacokinetics in old and young rats*. Life Sci 60 : 413-424 [38] ; [23] ; [34]).

10 À la même dose (1 mg/kg), la SSC calculée ($6,48 \pm 2,26 \mu\text{g/ml.h}$) et la TMS (Temps Moyen de Séjour) ($1,52 \pm 0,91 \text{ h}$) se trouvent dans les gammes des publications antérieures ($6,65 - 7,81 \mu\text{g/ml.h}$) pour la SSC et ($0,72 - 3,0 \text{ h}$) pour ma MRT.

15 Les profils de plasmas obtenus après administrations par intraveineuse sont bi-compartementaux comme dans les données publiées.

20 Peppas et al. (Peppas et al, (1985) *Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers*. Pharmaceutica Acta Helvetiae 60(4) : 110-111 [39] ; Peppas et Korssmeyer, (1987) *Dynamically swelling hydrogels in controlled applications, hydrogels in medicine and pharmacy. Vol 3 ; Properties and applications*. 3 : 109-136 [40]) ont introduit une équation semi-empirique (appelée « loi de puissance ») pour décrire la libération d'un médicament. La valeur de l'exposant n obtenu en suivant l'équation 2 est un indicateur des mécanismes de libération. Quand n est de l'ordre de 0,43 et 0,5, la diffusion de Fick s'applique ce qui signifie que la libération s'effectue par diffusion passive du médicament. Les valeurs expérimentales conduisent à une valeur n de 0,37 (Figure 11). Bien que la

valeur de K_m est hors de la gamme précitée, celle-ci est très proche de cette gamme. Cette différence peut être considéré comme non significative en vue des variabilités expérimentales. Dans ces conditions, la diffusion de Fick peut être utilisé comme principal mécanisme de diffusion de l'absorption et permet de rejeter l'hypothèse du mécanisme de Michaelis-Menten.

La nanoémulsion auto-émulsionnable de la présente invention est la première formulation orale à montrer une absorption orale de la gentamicine avec une biodisponibilité aussi importante ($98,8 \pm 33,8\%$).

Certaines formulations orales de gentamicine sous forme solide montrent une biodisponibilité de 14,1 % chez le rat et de 10,7% chez le chien ([34]) et de 22% pour les suspensions chez le chien (Prasad et al, (2003) *Evaluation of oral formulations of gentamicin containing labrasol in beagle dogs*. Int J Pharm 268 : 13-21 [41]).

L'inclusion de la gentamicine dans le cœur du système lipidique de la nanoémulsion multiple de la présente invention peut expliquer la meilleure biodisponibilité apportée par la formulation.

Il a été démontré que, pour des médicaments lipophiles incorporés dans une émulsion L/H, les mécanismes de solubilisation et de digestibilité sont les mécanismes responsables de l'amélioration de l'absorption (Smidt et al, (2004) *Intestinal absorption of penclomedine from lipid vehicles in the conscious rat: contribution of emulsification versus digestibility*. Int J Pharm 270 : 109-118 [42]). De plus, la taille des globules dans l'échelle nanométrique (260 nm) conduit à un meilleur taux de dispersion ce qui favorise l'absorption du médicament ([12]). L'utilisation de formulations lipidiques pour améliorer l'absorption de médicaments hautement hydrophiles a récemment été développée. Des formulations H/L auto-émulsionnable ([8]) permettent d'augmenter l'absorption intestinale par les voies de la lipolyse et des transporteurs lymphatiques ([16]).

La nanoémulsion tri-phasique de la présente invention, avec un cœur lipidique (émulsion H/L) suit probablement la même voie métabolique lipidique, expliquant ainsi le taux d'absorption élevé du médicament. De plus, l'utilisation de caprylocaproyl macrogo-8 glycéride (Labrasol®) contribue à l'amélioration observée de l'absorption.

Le Labrasol® est reconnu pour améliorer l'absorption de la gentamicine (Hu et al, (2002) *Diethyl fraction of labrasol having a stronger absorption enhancing effect on gentamicin that labrasol itself*. Int J Pharm 162 : 408-413 [43]). Cette propriété promotrice d'absorption a été expliquée par Koga et al. (Koga et al, (2006) *Enhancing mechanism of Labrasol intestinal membrane permeability of the hydrophilic drug gentamicin sulphate*. Eur J Pharm Biopharm 64 : 82-91 [44]) par la formation de micelles dans le tractus gastro-intestinal, facilitant ainsi l'absorption dans la muqueuse du tractus gastro-intestinal.

En plus de l'action de micellisation, le Labrasol® possède d'autres propriétés permettant l'amélioration de l'absorption. Toutefois, l'efficacité du Labrasol® sur l'amélioration de l'absorption de la gentamicine dépend de la concentration. À bases concentration (0,1 et 1%), le Labrasol® aurait une action d'ouverture des jonctions serrées (Sha et al, (2005) *effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junction in Caco-2 cells*. Eur J Pharm Sci 24 : 477-486 [45]). À des concentrations plus élevées (33%), il inhiberait les transporteurs des cellules épithéliales intestinales ([23]).

A cause de la toxicité potentielle du Labrasol® (LD₅₀ de 22g/kg chez le rat), la concentration en Labrasol® dans la nanoémulsion de la présente invention est de préférence basse, par exemple entre 0,05 et 0,5 ml/kg, par exemple entre 0,10 et 0,20 ml/kg, par exemple 0,15 ml/kg.

Par rapport à la toxicité du Labrasol® au niveau de la membrane intestinale, il a été démontré que des formulations de microémulsion H/L

avec 13% de Labrasol® ne provoquent pas de dommages des tissus intestinaux après plusieurs administrations orales ([9]).

En plus du Labrasol®, un surfactant non ionique est utilisé dans la formulation de la présente invention. Il est reconnu que les surfactants non-ioniques et les TCM sont capables de promouvoir l'absorption de médicaments polaires (Kim et Ku, (2000) *Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats*. Int J Pharm 194 : 81-89 [46]) avec une faible toxicité pour la membrane intestinale (Swenson et Curatolo, (1992) *Means to enhance penetration (2) Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs: mechanisms and potential toxicity*. Adv Drug Del Rev 8 : 39-92 [47]).

En ce qui concerne l'administration orale, il a été noté que la nanoémulsion de la présente invention donne un profil d'absorption prolongée avec une demi-vie de $2,43 \pm 0,36$ heures. Ces résultats peuvent être rapprochés des résultats obtenus pour une forme à libération prolongée de gentamicine (3 mg/kg) administrée par voie intramusculaire (demi-vie de $2,68 \pm 0,48$ heures) chez le lapin (Fonseca et al, (1996) *Design of a new formulation for sustained release of gentamicin: carbopol hydrogel*. Int J Pharm 133 : 265-268 [48]).

Avec la nanoémulsion de la présente invention, lorsque celle-ci est administrée oralement, la concentration de gentamicine dans le plasma est maintenue à plus de 2,5 µg/ml pendant six heures, et plus de 6 µg/ml pendant les deux premières heures, et plus de 4 µg/ml pendant les quatre premières heures. Ces valeurs sont supérieures à la concentration minimale inhibitrice (0,03-2 µg/ml).

Le profil d'absorption est biphasique avec une première phase où la vitesse d'absorption est rapide durant les trente premières minutes suivie d'une seconde phase où la vitesse d'absorption est moins élevée. Ces paramètres d'absorption satisfont le mécanisme d'action en deux temps

des aminosides avec une activité bactéricide rapide dépendante de la concentration en médicament (première phase), et une activité bactéricide plus lente indépendante de la concentration en antibiotique (Jackson et al, (1990) *The inductive role of ionic binding in the bactericidal and postexposure effects of aminoglycoside antibiotics with implications for dosing.* J Infect Dis 162 : 408-413 **[49]**).

L'administration orale de la gentamicine par la formulation de la présente invention est d'un intérêt majeur pour le traitement de maladies infectieuses chroniques telles que mucoviscidose, endocardite ou pyélonéphrite infectieuse.

Le profil prolongé de d'absorption de la forme orale de la présente invention peut être lié à la formulation à base de lipides où la gentamicine est incluse dans le cœur du système lipidique. Il a été reconnu que les médicaments hydrophiles sont incorporés principalement dans la phase aqueuse des cœurs des microémulsions H/L. Dans ces conditions, les médicaments sont libérés lentement (Podlogar et al, (2004) *Structural characterisation of water-tween 40/imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods.* Int J Pharm 276 : 115-128 **[50]**) De plus, l'inclusion de gentamicine modifie le profil d'absorption du médicament qui dépend alors de la digestion lipidique. Un profil d'absorption prolongée a déjà été trouvée pour une émulsion L/H incluant un médicament lipophile (**[12]**).

Des systèmes de délivrance de médicament auto-émulsionnable utilisent une émulsion de type H/L/H formée *in vivo* dans les fluides intestinaux à partir d'une microémulsion H/L. Dans ce type de système, l'émulsion obtenue est grossière avec un profil polydispersé et des globules de grosse taille (**[9]**).

La formulation de la présente invention est auto-émulsionnée *in vitro* et fournit un profil granulométrique monodispersé d'émulsion H/L/H avec

des tailles de globules dans l'échelle nanométrique. La taille maximale des globules est inférieure à 1 μ m.

De plus, lorsque l'auto-émulsification est réalisée *in vivo* chez le rat, dans les mêmes conditions que la nanoémulsion de la présente invention, les paramètres pharmacocinétiques ne sont pas déterminables à cause du temps d'absorption trop long et de la grande variabilité entre chaque individu.

L'originalité de la formulation de la présente invention est d'utiliser un procédé de double auto-émulsification donnant dans une première étape un diamètre de 5.85 ± 0.04 nm avec un index de polydispersité de 0.22 ± 0.03 , et dans une seconde étape une émulsion multiple avec des diamètres dans l'échelle nanométrique, inférieurs à 1 μ m. La taille des globules de la formulation de la présente invention se distingue des émulsions H/L/H de l'art antérieur. En effet, une émulsion H/L/H incluant de la vancomycine, préparée par une méthode sous agitation ou par une méthode d'émulsification sur membrane, montre des tailles de diamètre au dessus de l'échelle nanométrique avec des diamètres d'environ 20 μ m (Okochi et Nanako, (2000) *Preparation and evaluation of w/o/w type emulsions containing vancomycin*. Adv Del Rev 45 : 5-26 [51]).

20

Liste des références

- [1] Palin KJ et al. (1986) *The oral absorption of cefoxitin from oil and emulsion vehicles in rats*. Int J Pharm, 33 : 99-104
- 5 [2] Kararli et al. (1992) *Oral delivery of a renin inhibitor compound using emulsion formulations*. Pharm Res 9 : 888-893
- [3] Myers et al. (1992) *Systemic bioavailability of penclomedine (NCS-33872) from oil-in-water emulsions administered intraduodenally to rats*. Int J Pharm 78 : 217-226
- 10 [4] Pouton (1997) *Formulation of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS)*. Adv Drug Del Rev 25 : 47-48
- [5] Gursoy et Benita (2004) *Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs*. Biomed Pharmacother 58 : 173-182
- 15 [6] Hong et al.(2006) *A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption*. J Control Release 110 : 332-338
- [7] Constantinides et al, (1994) *Water-in-oil microémulsion incorporating medium-chain glycerides: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation in the rats*. Pharm Res 11 : 1385-1390
- 20 [8] Constantinides (1995) *Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects*. Pharm Res, 12(11): 1561-1572.
- [9] Cheng et al, (2008) *Characterization of water-in-oil microemulsion for oral delivery of earthworm fibrinolytic enzyme*. J Control Release 25 129:41-48
- [10] Silva-Cunha et al, (1997) *W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer:*

- preparation, characterisation and determination of stability towards proteases in vitro.* Int J Pharm 158 : 79-89
- [11] Crauste-Manciet et al, (1998) *Cefpodoxime proxetil hydrolysis protection by o/w submicron emulsions.* Int J Pharm 165 : 97-106
- 5 [12] Nicolaos et al, (2003) *Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil-in-water submicron emulsion.* Int J Pharm 263(1-2) : 165-171
- [13] Singh et Vingkar, (2008) *Formulation, antimalaria activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of pimaquine.* Int J Pharm
10 347 : 136-143
- [14] Vyas et al, (2008) *Improved oral bioavailability and brain transport of saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations.* Int J Pharm 347 : 93-101
- [15] MacGregor et al, (1997) *Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract.* Adv Drug Del Rev 25 : 33-46
15
- [16] O'Driscoll, (2002) *Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery.* Eur J Pharm Sci 15 : 405-415
- [17] Amidon et al, (1995) *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.* Pharm Res. 12 : 413-420
20
- [18] Fantin et al, (1991) *Factors affecting duration of in-vivo postantibiotic effect for aminoglycosides against gram-negative bacilli.* J Antimicrob Chemother 27 : 829-836
- [19] Drabu et Blakemor, (1990) *Comparative post-antibiotic effect of five antibiotics against ten aerobic gram-positive cocci.* Drug Exp Clin Res
25 16 : 557-563
- [20] Artursson et al, (1993) *Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human*

intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. Pharm Res 10 : 1123-1129

- [21] Ranaldi et al, (1992) *Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 36 : 1374-1381*
5
- [22] Banerjee et al, (2000) *Bioavailability of tobramycin after oral delivery in FVB mice using CRL-1605 copolymer, an inhibitor of P-glycoprotein. Life Sci 67 : 2011-2016*
- [23] Hu et al, (2001) *A novel emulsifier, Labrasol enhance gastrointestinal absorption of gentamicin. Life Sci 69 : 2899-2910*
10
- [24] Axelrod et al, (1998) *Intestinal transport of gentamicin with a novel, glyco steroid drug transport agent. Pharm Res 15 : 1876-1881*
- [25] Horstkotte et al, (2004) *Guideline on prevention, Diagnosis and treatment of infective endocarditis executive summary: The task force on infective endocarditis of the european Society of cardiology. European Heart journal 25(3) : 267-276*
15
- [26] Pouton et al, (1985) *Self-emulsifying drug delivery systems : assessment of the efficiency of emulsification. Int J Pharm 27 : 335-348*
- [27] Constantinides et al, (1995) *Enhanced intestinal absorption of an GRD peptide from water-in-oil microemulsions of different composition and particle size. J control release 34 : 109-116*
20
- [28] Constantinides et al, (1996) *Water-in-oil microemulsions containing medium-chain fatty acids / salts: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation. Pharm Res 13 : 210-215*
25
- [29] Porrás et al, (2008) *Properties of water-in-oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-energy emulsification method. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 324 : 181-188*

- [30] Okochi et Nakano, (2000) *Preparation and evaluation of w/o/w type emulsions containing vancomycin*. Adv Drug Del Rev 45 : 5-26
- [31] Cournarie et al, (2004) *Insulin-loaded w/o/w multiple: comparison of performances of systems prepared with medium-chain-triglycerides and fish oil*. Eur J Pharm Biopharm 58 : 477-482
- 5 [32] Bonnet et al, (2009) *Release rate profiles of magnesium from multiple w/o/w emulsions*. Food Hydrocolloids 23 : 92-101
- [33] Hanson et al, (2008) *Nanoscale double emulsion stabilized by single-component block copolypeptides*. Nature 455 : 85-88
- 10 [34] Ito et al, (2005) *Oral solid gentamicin preparation using emulsifier and adsorbent*. J Control Release 105 : 23-31
- [35] Waeldele et Stoclet, (1973) *Permanent catheterization of the thoracic aorta. Direct measure of blood pressure, injection of substances, and blood sampling in the waking rat*. J Physiol 66 : 357-366
- 15 [36] Barza et al, (1975) *Predictability of blood levels of gentamicin in man*. J Infect Dis 132(2) : 165-174
- [37] Lecaroz et al, (2006) *Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method*. J antimicrob Chhemther 58(3) : 557-563
- 20 [38] Taniara et al, (1997) *Effect of endotoxin on gentamicin pharmacokinetics in old and young rats*. Life Sci 60 : 413-424
- [39] Peppas et al, (1985) *Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers*. Pharmaceutica Acta Helvetiae 60(4) : 110-111
- 25 [40] Peppas et Korssmeyer, (1987) *Dynamically swelling hydrogels in controlled applications, hydrogels in medicine and pharmacy. Vol 3 ; Properties and applications*. 3 : 109-136

- [41] Prasad et al, (2003) *Evaluation of oral formulations of gentamicin containing labrasol in beagle dogs*. Int J Pharm 268 : 13-21
- [42] Smidt et al, (2004) *Intestinal absorption of penclomedine from lipid vehicles in the conscious rat: contribution of emulsification versus digestibility*. Int J Pharm 270 : 109-118
- 5 [43] Hu et al, (2002) *Diethyl fraction of labrasol having a stronger absorption enhancing effect on gentamicin than labrasol itself*. Int J Pharm 162 : 408-413
- [44] Koga et al, (2006) *Enhancing mechanism of Labrasol intestinal membrane permeability of the hydrophilic drug gentamicin sulphate*. Eur J Pharm Biopharm 64 : 82-91
- 10 [45] Sha et al, (2005) *effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junction in Caco-2 cells*. Eur J Pharm Sci 24 : 477-486
- [46] Kim et Ku, (2000) *Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats*. Int J Pharm 194 : 81-89
- 15 [47] Swenson et Curatolo, (1992) *Means to enhance penetration (2) Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs: mechanisms and potential toxicity*. Adv Drug Del Rev 8 : 39-92
- 20 [48] Fonseca et al, (1996) *Design of a new formulation for sustained release of gentamicin: carbopol hydrogel*. Int J Pharm 133 : 265-268
- [49] Jackson et al, (1990) *The inductive role of ionic binding in the bactericidal and postexposure effects of aminoglycoside antibiotics with implications for dosing*. J Infect Dis 162 : 408-413
- 25 [50] Podlogar et al, (2004) *Structural characterisation of water-tween 40/imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods*. Int J Pharm 276 : 115-128

[51] Okochi et Nanako, (2000) *Preparation and evaluation of w/o/w type emulsions containing vancomycin*. Adv Del Rev 45 : 5-26

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'une nanoémulsion comprenant les étapes suivantes :

5

(a) préparation d'une première solution aqueuse,

(b) mélange d'un émulsifiant non ionique, de glycéride polyglycolysé et d'au moins un triglycéride dont les chaînes d'acide gras comprennent entre 8 et 12 atomes de carbone, dans lequel le ratio émulsifiant non ionique/glycéride polyglycolysé est compris entre 9/1 et 6/4,

10

(c) formation d'une émulsion hydrophile/lipophile (H/L) par ajout de la première solution aqueuse obtenue à l'étape (a) dans le mélange obtenu à l'étape (b), et

15

(d) formation de la nanoémulsion multiple hydrophile/lipophile/hydrophile (H/L/H) par ajout de l'émulsion obtenue à l'étape (c) dans une seconde solution aqueuse.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel les étapes (a) à (d) sont réalisées à une température comprise entre 15°C et 25°C.

20

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel l'émulsifiant non ionique est un ester de sorbitanne polyhydroxyéthylé.

4. Procédé selon la revendication 3 dans lequel l'ester de sorbitanne polyhydroxyéthylé comprend entre 20 et 85 molécules d'oxyde d'éthylène.

25

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le glycéride polyglycolysé est choisi dans le groupe comprenant un mélange de mono, di et triesters de glycérol, de polyéthylène glycol avec

30

des acides gras dont les chaînes comprennent entre 8 et 10 atomes de carbone.

5 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel l'au moins un triglycéride dont les chaînes d'acide gras comprennent entre 8 et 12 atomes de carbone est un triglycéride caprylique, un triglycéride caprique ou leur mélange.

10 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comprenant en outre une étape de solubilisation d'une substance active dans la première solution aqueuse à l'étape (a).

15 8. Procédé selon la revendication 7, dans laquelle la substance active est une molécule polaire.

9. Procédé selon la revendication 8, dans laquelle la substance active est une molécule hydrophile.

20 10. Procédé selon la revendication 7, dans laquelle la substance active est choisie dans le groupe comprenant les aminosides, les anticancéreux, les antalgiques, les vitamines, les antiépileptiques, les peptides, les protéines, les oligonucléotides, ou un mélange de deux ou plusieurs de ces substances.

25 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans lequel l'incorporation de l'émulsion obtenue à l'étape (c) dans la seconde solution aqueuse est réalisée avec un ratio émulsion/seconde solution aqueuse compris entre 1/1 et 1/10.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans laquelle la première solution aqueuse et la deuxième solution aqueuse sont identiques ou différentes.

5 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans laquelle la première solution aqueuse et la deuxième solution aqueuse sont de l'eau, une solution de glycérol, une solution d'acide chlorhydrique, une solution de soude ou une solution saline (une solution de chlorure de sodium, une solution de ringer, une solution de ringer-
10 lactate, une solution de phosphates mono ou di sodiques, une solution acétate ou tout autre solution tampon.

14. Nanoémulsion susceptible d'être obtenue par le procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15 15. Nanoémulsion selon la revendication 14, comprenant, en pourcentage en poids par rapport à la nanoémulsion :
- entre 2 et 35 %, d'émulsifiant non ionique,
- entre 1 % et 30 % de glycéride polyglycolysé,
20 - entre 2 et 50 % de triglycéride dont les chaînes d'acide gras comprennent entre 8 et 12 atomes de carbone, et
- entre 1 et 95 % de solution aqueuse.

25 16. Utilisation d'une nanoémulsion telle que définie dans la revendication 14 ou 15 pour la fabrication d'un médicament.

17. Médicament comprenant une nanoémulsion telle que définie dans la revendication 14 ou 15 et une substance active.

30 18. Médicament selon la revendication 17, dans laquelle la substance active est telle que définie dans les revendications 8 à 10.

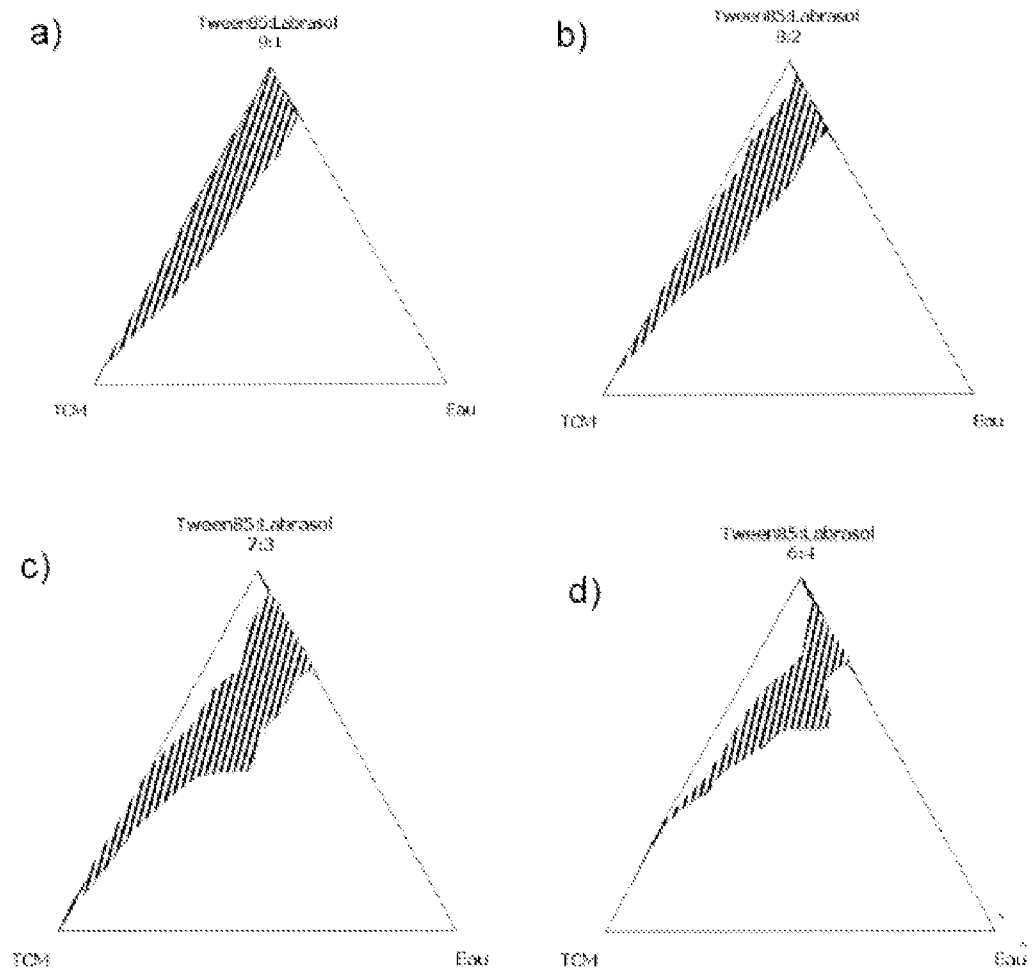


Figure 1

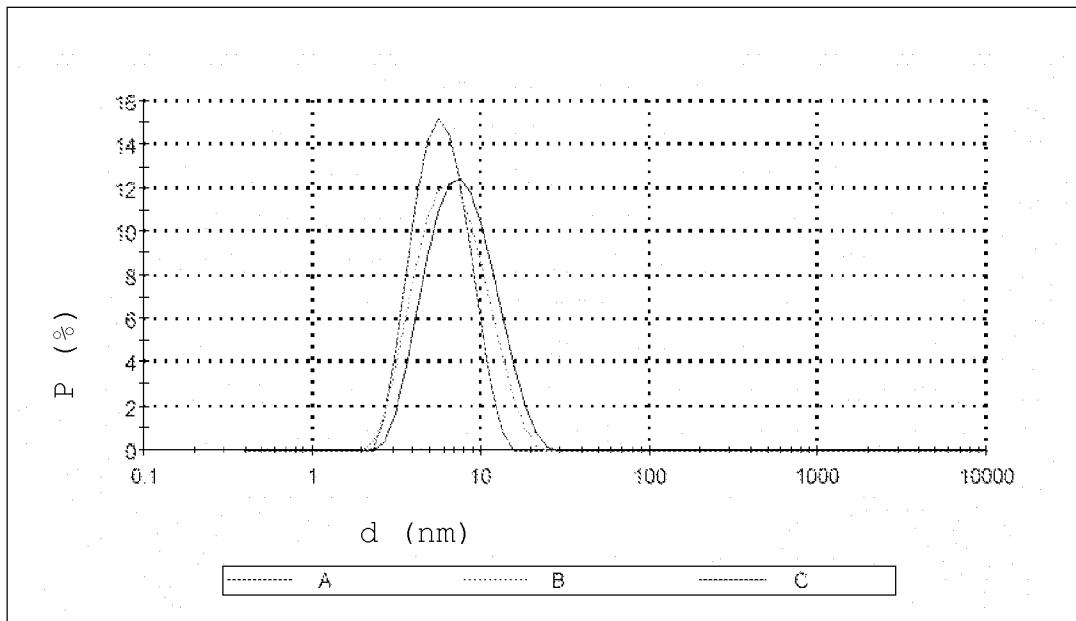


Figure 2

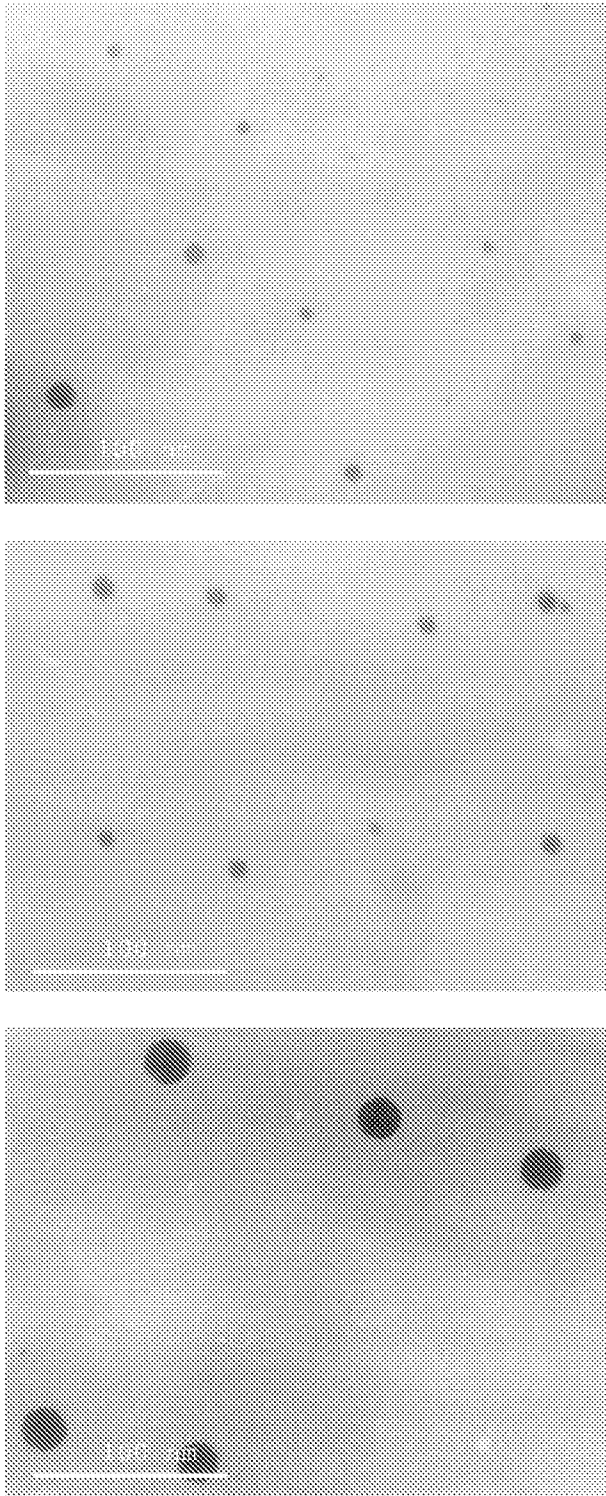


Figure 3

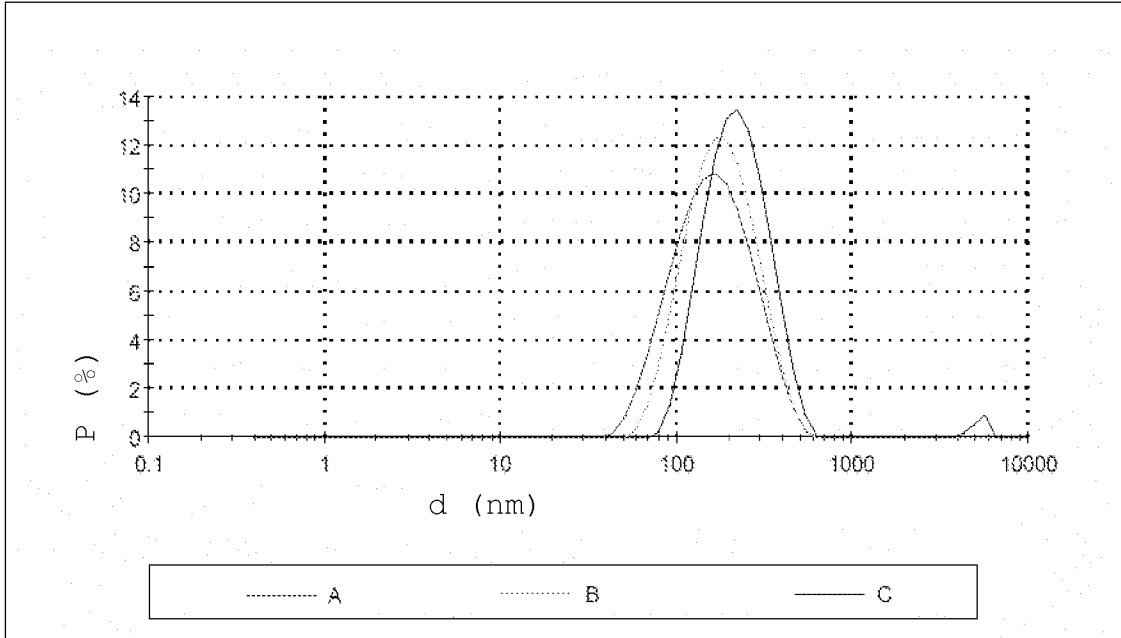


Figure 4

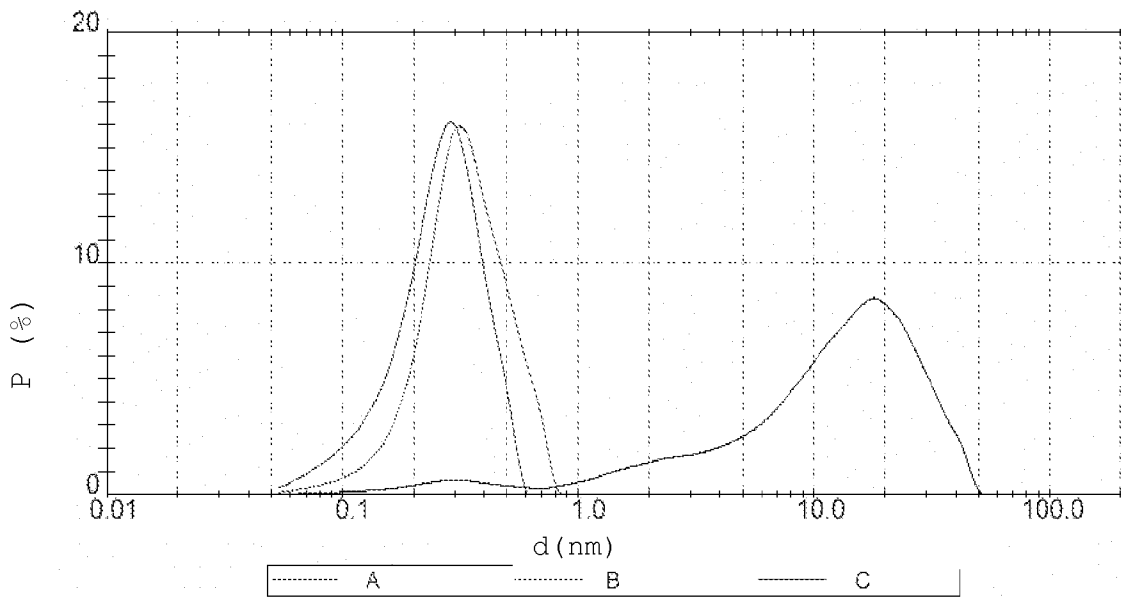


Figure 5

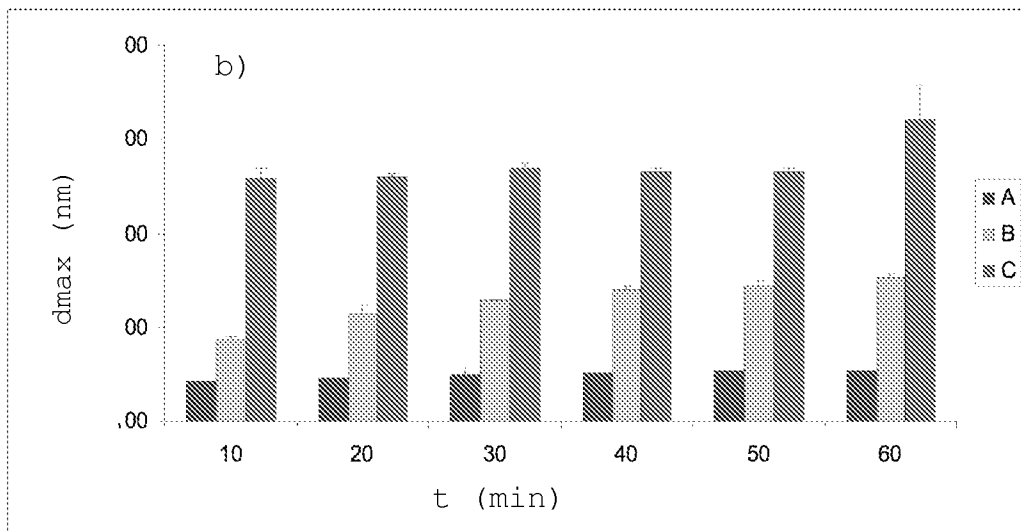
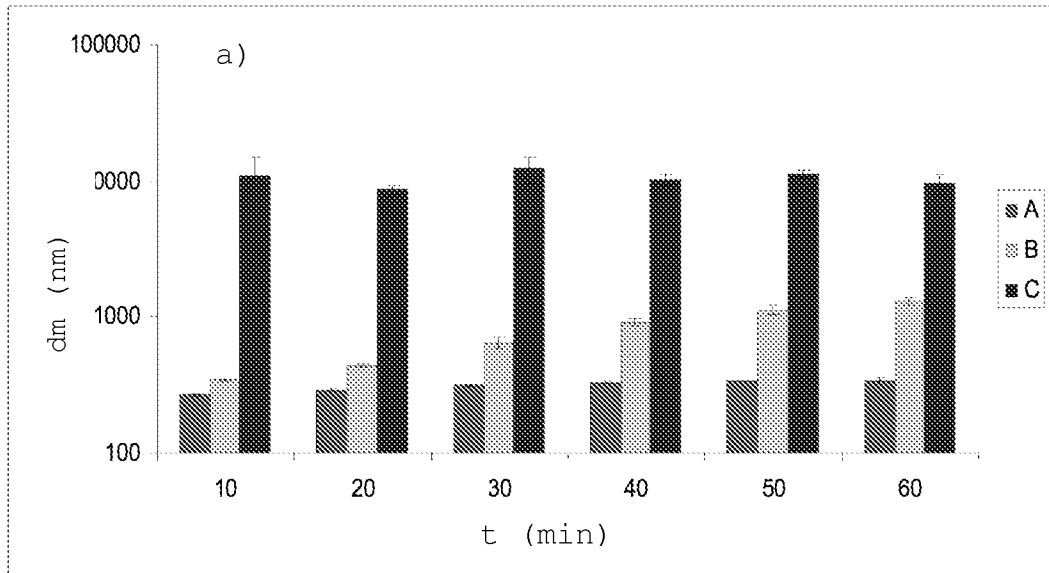


Figure 6

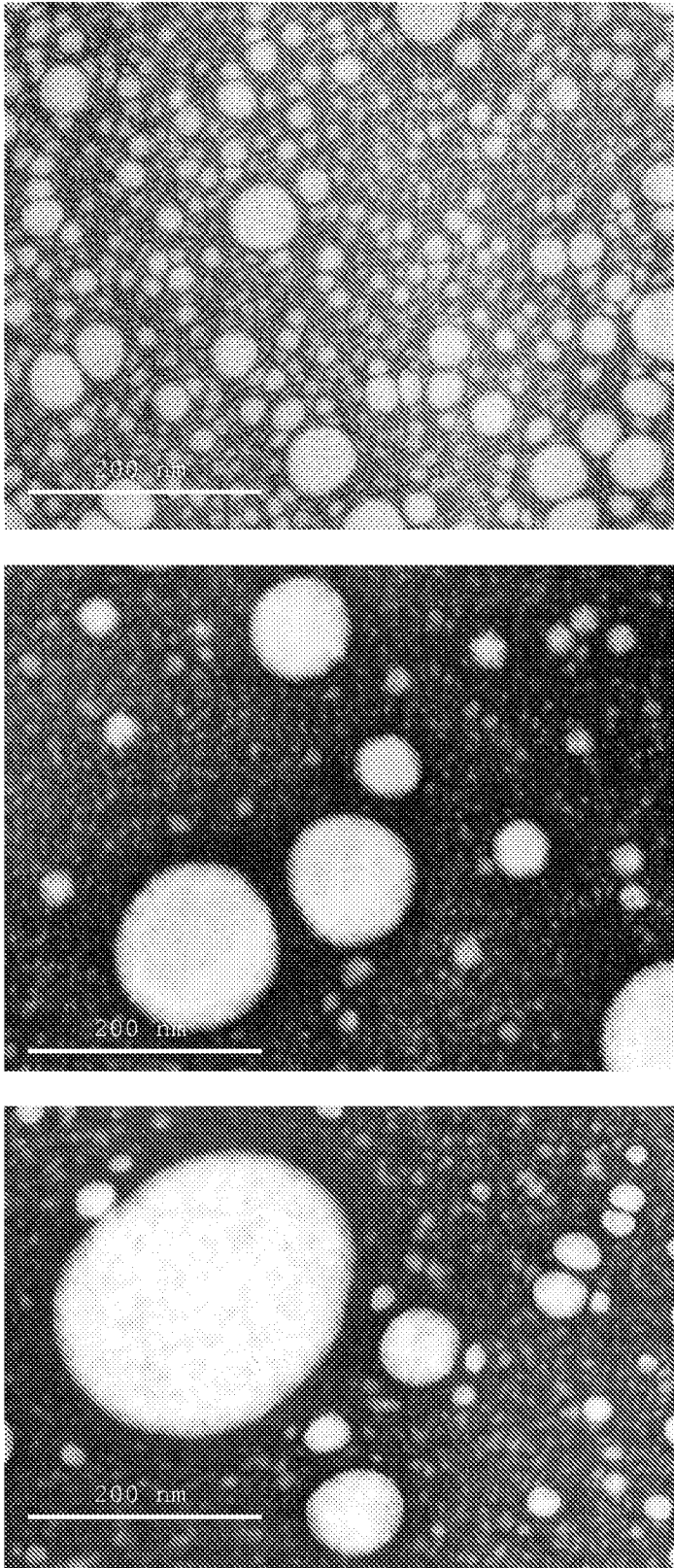


Figure 7

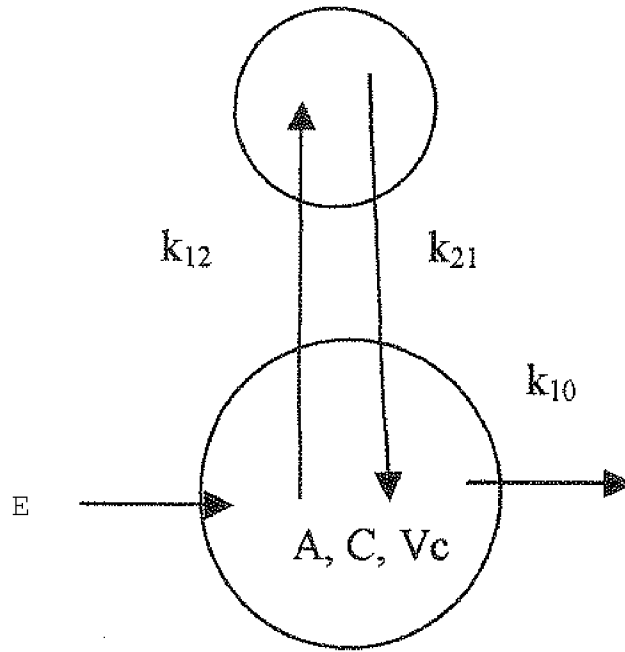


Figure 8

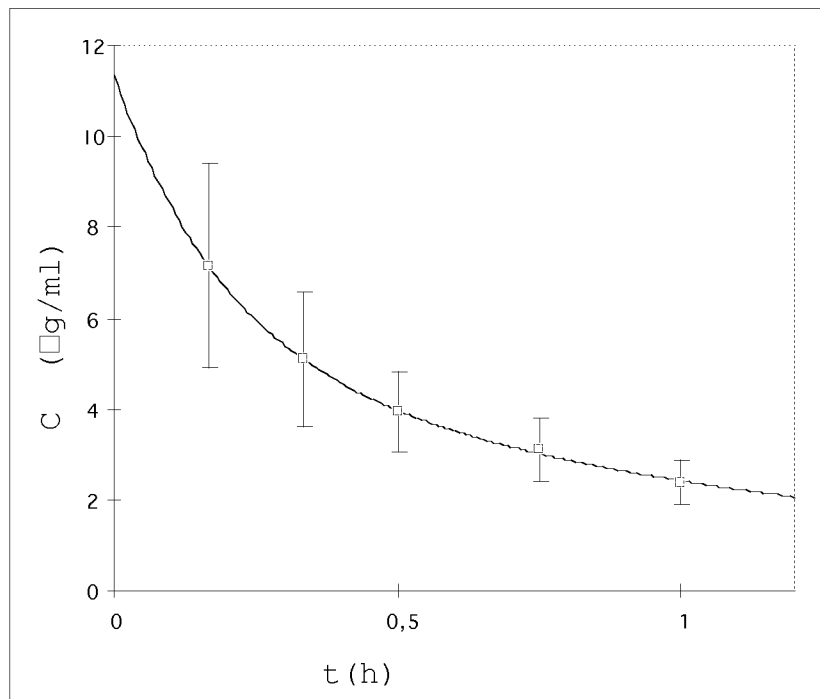


Figure 9

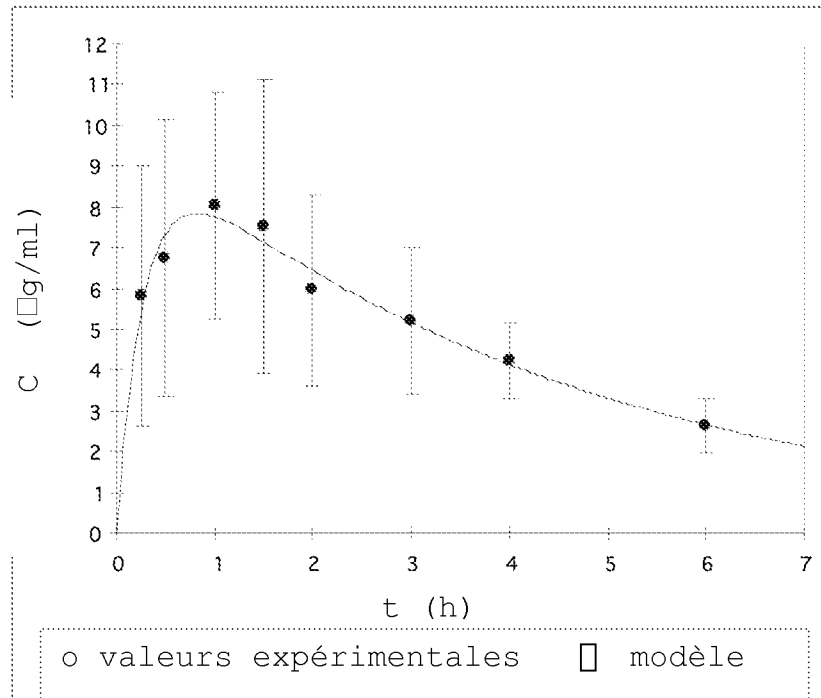


Figure 10

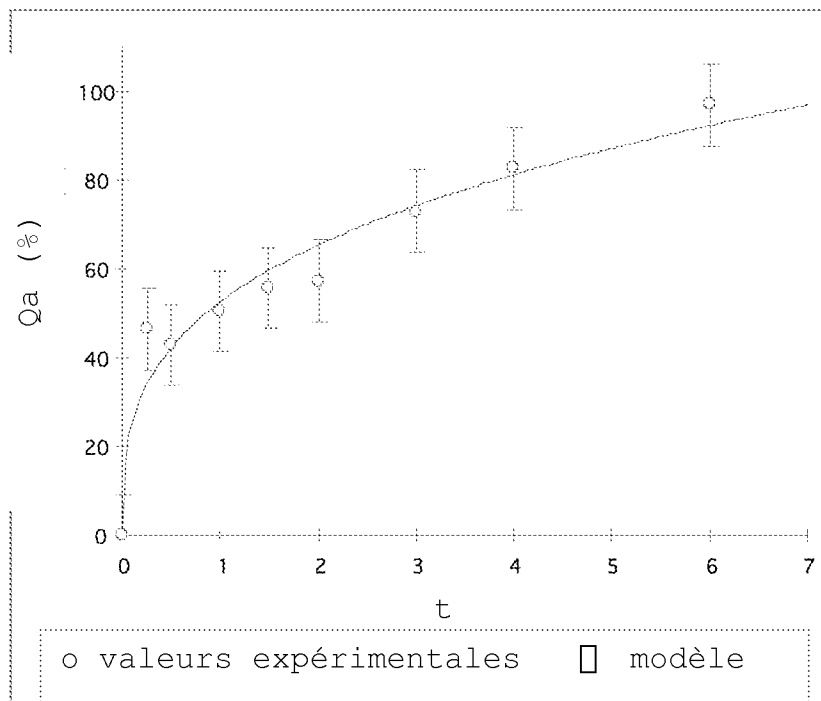
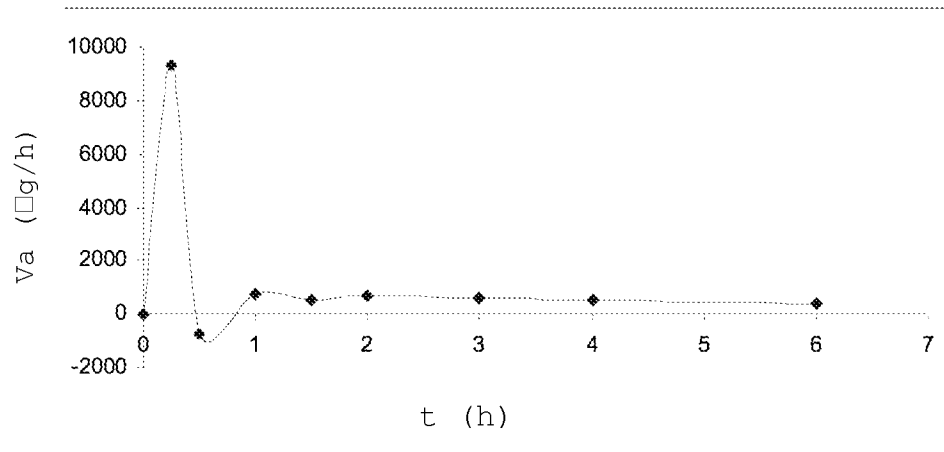


Figure 11

**Figure 12**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/052493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K9/113 B01F17/44
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A61K B01F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
 EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	F. SHAKEEL ET AL.: "Nanoemulsions as Vehicles for Transdermal Delivery of Aceclofenac" AAPS PHARMSCITECH, vol. 8, no. 4, 14 December 2007 (2007-12-14), pages E1-E9, XP002540442 the whole document	1-18
A	G. NICOLAOS ET AL.: "Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil -in-water submicron emulsion" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 263, 2003, pages 165-171, XP002540443 the whole document	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 15 April 2010	Date of mailing of the international search report 22/04/2010
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Grittern, Albert
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/052493

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95/05078 A (PHARMOS CORP [US]) 23 February 1995 (1995-02-23) page 3, line 21 - page 4, line 21; claims; examples 8-15,17-23 -----	1-18
A	GURSOY R N ET AL: "Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs" BIOMEDICINE AND PHARMACOTHERAPY, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 58, no. 3, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 173-182, XP002500493 ISSN: 0753-3322 cited in the application the whole document -----	1-18
A	WO 2007/112967 A (ENI SPA [IT]; POLMIERI EUROPA S P A [IT]; DEL GAUDIO LUCILLA [IT]; LOC) 11 October 2007 (2007-10-11) claims; examples -----	1-18
A	SINGH ET AL: "Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 347, no. 1-2, 29 November 2007 (2007-11-29), pages 136-143, XP022369806 ISSN: 0378-5173 cited in the application -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2009/052493

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9505078	A	23-02-1995	AU 7376794	14-03-1995
			IL 110587	22-12-1999
			US 5514670	07-05-1996
WO 2007112967	A	11-10-2007	CA 2646175	11-10-2007
			CN 101443436	27-05-2009
			EP 2001981	17-12-2008
			JP 2009538221	05-11-2009
			KR 20090007383	16-01-2009
			US 2009118380	07-05-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/052493

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 INV. A61K9/113 B01F17/44
 ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 A61K B01F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
 EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	F. SHAKEEL ET AL.: "Nanoemulsions as Vehicles for Transdermal Delivery of Aceclofenac" AAPS PHARMSCITECH, vol. 8, no. 4, 14 décembre 2007 (2007-12-14), pages E1-E9, XP002540442 le document en entier	1-18
A	G. NICOLAOS ET AL.: "Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil -in-water submicron emulsion" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 263, 2003, pages 165-171, XP002540443 le document en entier	1-18
	----- -/-	

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

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 avril 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/04/2010

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

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

Fonctionnaire autorisé

Grittern, Albert

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/052493

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 95/05078 A (PHARMOS CORP [US]) 23 février 1995 (1995-02-23) page 3, ligne 21 - page 4, ligne 21; revendications; exemples 8-15,17-23</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-18
A	<p>GURSOY R N ET AL: "Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs" BIOMEDICINE AND PHARMACOTHERAPY, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 58, no. 3, 1 avril 2004 (2004-04-01), pages 173-182, XP002500493 ISSN: 0753-3322 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-18
A	<p>WO 2007/112967 A (ENI SPA [IT]; POLMIERI EUROPA S P A [IT]; DEL GAUDIO LUCILLA [IT]; LOC) 11 octobre 2007 (2007-10-11) revendications; exemples</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-18
A	<p>SINGH ET AL: "Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 347, no. 1-2, 29 novembre 2007 (2007-11-29), pages 136-143, XP022369806 ISSN: 0378-5173 cité dans la demande</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/052493

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9505078 A	23-02-1995	AU 7376794 A	14-03-1995
		IL 110587 A	22-12-1999
		US 5514670 A	07-05-1996

WO 2007112967 A	11-10-2007	CA 2646175 A1	11-10-2007
		CN 101443436 A	27-05-2009
		EP 2001981 A1	17-12-2008
		JP 2009538221 T	05-11-2009
		KR 20090007383 A	16-01-2009
		US 2009118380 A1	07-05-2009
