

(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
28 septembre 2017 (28.09.2017)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/162963 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
A23K 40/30 (2016.01) A61K 9/51 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2017/050622
- (22) Date de dépôt international :
17 mars 2017 (17.03.2017)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
16/52592 25 mars 2016 (25.03.2016) FR
- (71) Déposant : ADISSEO FRANCE S.A.S. [FR/FR]; 10
place du Général de Gaulle, Antony Parc 2, 92160 ANTO-
NY (FR).
- (72) Inventeurs : PREVERAUD, Damien; 1 rue Favières,
03310 Nérès les Bains (FR). ROSILIO, Véronique; 12bis
rue Gobert, 75011 Paris (FR).
- (74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU;
B.P.6153, 69466 LYON Cedex 06 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS,
RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

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

(54) Title : NANOCAPSULES COMPRISING A LIPOSOLUBLE ACTIVE INGREDIENT, PRODUCTION AND USES

(54) Titre : NANOCAPSULES DE PRINCIPE ACTIF LIPOSOLUBLE, FABRICATION ET UTILISATIONS

(57) Abstract : The invention relates to nanocapsules in the form of a colloidal suspension or in a dry form, said nanocapsules comprising at least one active ingredient in the form of an oil, an ionic surfactant, optionally a non-ionic surfactant, and a hydrophilic polymer. The invention also relates to the production and uses of said nanocapsules.

(57) Abrégé : L'invention concerne des nanocapsules sous forme d'une suspension colloïdale ou sous forme sèche, lesdites nanocapsules comprenant au moins un principe actif sous forme d'une huile, un tensioactif ionique, éventuellement un tensioactif non ionique, et un polymère hydrophile. L'invention concerne aussi leur fabrication et leurs utilisations.



WO 2017/162963 A1

NANOCAPSULES DE PRINCIPE ACTIF LIPOSOLUBLE, FABRICATION ET UTILISATIONS

L'invention concerne des nanocapsules de principes actifs liposolubles, leur procédé de fabrication et leurs utilisations.

5 Les molécules, comme les vitamines, les acides gras, les huiles essentielles, sont très largement employées dans de nombreux domaines techniques tels que les industries pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, et notamment dans le domaine de la nutrition animale. A titre d'exemple, les vitamines A et E sont couramment utilisées pour la préparation d'aliments favorisant la croissance et la
10 santé d'animaux.

Leur nature hydrophobe et leur fragilité environnementale, notamment thermique et chimique, tant au cours de leur formulation et de leur stockage, que lors de leur utilisation, rendent nécessaire leur encapsulation.

La vitamine E, ou tocophérol (TOL en abrégé) existant majoritairement sous la
15 forme d- α -tocophérol (α TOL), est, à l'état natif, un liquide huileux, lipophile, miscible en toutes proportions dans toute phase hydrophobe ou lipidique. Elle est extrêmement instable, et aisément oxydable, et, à l'état oxydé, elle perd l'essentiel de son activité biologique. Sa biodisponibilité chez l'animal n'excède pas 50% quand elle est administrée par voie orale, car, rapidement oxydée, elle est majoritairement
20 absorbée dans cette forme oxydée, inactive. Aussi, quand elle est administrée par voie orale, la vitamine E l'est sous la forme d'un dérivé plus stable, généralement choisi parmi les esters, par exemple l'acétate, et les sels de vitamine E.

La vitamine A existe sous plusieurs formes, notamment à l'état d'ester, et c'est sous l'une de ses formes les plus stables, l'acétate de rétinyle, qu'elle est le plus
25 souvent consommée par les animaux d'élevage (volaille, porcs et bovins). Elle reste toutefois sensible à l'oxydation, à la température, à la lumière, aux acides. En application pharmaceutique ou en nutrition animale, elle est ainsi très rapidement dégradée dès qu'elle entre en contact avec les premières conditions sévères, notamment acides, du système digestif, ce qui n'en fait pas une forme biodisponible
30 de la vitamine A.

Afin de préserver au mieux ces principes actifs sensibles, il est connu depuis longtemps qu'on peut les protéger par enrobage ou encapsulation. Diverses voies d'encapsulation des vitamines notamment A et E ont été développées et largement utilisées, comme celle impliquant des protéines.

35 On est toutefois toujours à la recherche d'une formulation d'un principe actif liposoluble qui serait hautement biodisponible.

Les auteurs ont recherché une nouvelle formulation de tels principes actifs qui soit capable d'augmenter leur absorption notamment leur absorption intestinale.

La plupart de ces principes actifs étant généralement utilisés dans leur forme protégée, il était en outre essentiel de développer une formulation qui permette que
5 lesdits principes actifs soient absorbés dans leur forme libre, active, ce qui signifie que l'hydrolyse de la forme protégée et l'absorption doivent se produire quasiment simultanément.

Les auteurs ont d'abord découvert que de tels principes actifs pouvaient être formulés en nanocapsules à haute teneur en dits principes actifs, et cela grâce à un
10 procédé propre au sens où il n'a recours à aucun solvant organique. Puis les auteurs ont mis au point des nanocapsules capables de libérer, de manière efficiente, la forme active du principe actif, à savoir, dans une forme satisfaisant l'ensemble des impératifs ci-dessus.

Ainsi l'invention concerne une formulation de principe(s) actif(s) liposoluble(s)
15 en teneur élevée, sous forme de nanocapsules, laquelle, dans une variante préférentielle, présente une biodisponibilité supérieure aux formulations du marché actuel.

L'invention vise en outre la mise en œuvre d'un procédé de fabrication industrialisable et respectueux de l'environnement, pour obtenir de telles
20 nanocapsules. De plus, le procédé mis au point par les auteurs conduit à des nanocapsules possédant une humidité résiduelle basse, de préférence inférieure à 8%, ce qui leur confère une stabilité dans le temps, quelles que soient les conditions de stockage.

Selon le domaine d'application du principe actif, les nanocapsules de
25 l'invention peuvent être mises sous une forme en vue d'une manipulation plus facile, par exemple sous forme de microparticules, notamment par adsorption desdites nanocapsules sur un support. Dans la suite de la description, le terme « particule » sera réservé à toute présentation desdites nanocapsules, et à titre d'exemple, de telles particules sont des microparticules comprenant des nanocapsules de
30 l'invention. Si le principe actif est destiné à la nutrition animale, il est ainsi particulièrement avantageux que les nanocapsules soient formulées en particules sèches présentant une excellente mixabilité pour leur incorporation dans un prémix. Dans cette indication, de telles particules sont des microparticules d'une taille moyenne inférieure à 300 μm .

35 Les différents objets de l'invention vont maintenant être exposés en détail.

L'invention est ci-après plus particulièrement décrite en référence à la vitamine E, mais bien entendu, son cadre n'y est pas restreint, et elle s'applique à toute substance active liposoluble et tout mélange de telles substances.

Comme dit précédemment, l'invention a pour objet des nanocapsules
5 comprenant au moins un principe actif liposoluble, en une concentration élevée, qui sont stables et qui peuvent être hautement biodisponibles. Les nanocapsules de l'invention peuvent se présenter sous forme d'une suspension colloïdale, ou sous forme sèche, après séchage de cette suspension.

Qu'elles soient sous forme d'une suspension colloïdale, ou sous forme sèche,
10 lesdites nanocapsules comprennent au moins une fraction huileuse comprenant ou consistant en un principe actif liposoluble et un tensioactif ionique, ainsi qu'un polymère de préférence hydrophile entourant ladite fraction huileuse.

Les auteurs ont découvert de manière inattendue que pour rendre la vitamine E biodisponible, ou à tout le moins augmenter sa biodisponibilité, les nanocapsules
15 devaient en outre comprendre au moins un tensioactif non ionique. Bien entendu, en fonction des indications du principe actif, cette biodisponibilité pourra ne pas être recherchée, voire proscrite, alors les nanocapsules seront dépourvues d'un tel tensioactif non ionique.

Comme déjà évoqué, les nanocapsules de l'invention permettent de véhiculer
20 tout principe actif liposoluble. Ainsi, celui-ci peut être choisi parmi :

les vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D, E, K, leurs dérivés, notamment esters par exemple acétate, propionate ou succinate, ainsi que leurs métabolites comme le rétinol, l'acide rétinoïque, le 25-hydroxycholecalciférol, le 1,25 dihydroxycholecalciférol ;

25 les caroténoïdes ;

les huiles essentielles telles que des huiles essentielles de thym, d'origan, de romarin, d'ail, de camélia, de moutarde, de gingembre, de curcuma, de raisin, d'agrumes, de sainfoin, de yucca, d'armoise, de cannelle, de menthe, de clou de girofle, de baies, de cumin et d'Echinacea ;

30 les acides gras, saturés, mono-insaturés et poly-insaturés ;

les huiles grasses.

Si le principe actif est liquide ou susceptible de l'être par chauffage, il peut constituer à lui-seul la phase huileuse dans laquelle le tensioactif ionique sera présent.

S'il n'est pas à l'état liquide à la température de fabrication des nanocapsules,
35 il peut être préalablement solubilisé dans une huile, généralement inerte, qui servira de support. A titre d'exemple, cette huile peut être la trioléine.

Un intérêt des nanocapsules de l'invention réside dans leur teneur en principe actif qui peut varier d'un minimum par exemple de 5% en masse par rapport à la masse sèche des nanocapsules (m/m), à plus de 50%, voire même au moins 90%. Cette teneur sera déterminée en fonction de la destination des nanocapsules, elle est
5 généralement d'au moins 5% en masse par rapport à la masse sèche des nanocapsules (m/m), de préférence d'au moins 25%, et mieux encore d'au moins 50%, voire d'au moins 70%, même d'au moins 90%.

Ledit tensioactif ionique est de préférence choisi parmi ceux dont le poids moléculaire est d'au plus 1500 g/mol, voire d'au plus 1000 g/mol. Au-dessus de
10 1500 g/mol, les nanocapsules sont difficilement formées. Parmi ces tensioactifs préférés, on peut retenir les phosphatidylcholines, telles que la lécithine d'œuf ou la lécithine de soja, ou le bromure d'hexadécyl triméthylammonium. Le tensioactif ionique, chargé positivement ou négativement, est sélectionné pour être de charge opposée à celle du polymère.

Ledit tensioactif non ionique est de préférence choisi parmi les copolymères à blocs polyoxyéthylène-polyoxypropylène, les mélanges de copolymères à blocs polyoxyéthylène (EO)-polyoxypropylène (PO), le Tween 80, les esters d'acides gras et de saccharose et notamment les palmitates et les stéarates, et tout mélange de ceux-ci. Dans le cadre de cette définition, les tensioactifs préférés sont choisis parmi les
20 copolymères de formule $EO_x-PO_y-EO_x$ dans laquelle x varie de 75 à 85 et y varie de 25 à 35, les copolymères de formule $EO_x-PO_y-EO_x$ dans laquelle x varie de 55 à 65 et y varie de 35 à 45 et les copolymères de formule $EO_x-PO_y-EO_x$ dans laquelle x varie de 112 à 123 et y varie de 40 à 50, ainsi que les esters d'acides gras et de saccharose commercialisés sous les marques SISTERNA® SP70 et PS750.

Le ou les polymères permettant d'obtenir des nanocapsules selon l'invention sont choisis parmi des polymères cationiques ou anioniques, la charge du polymère étant opposée à celle du tensioactif ionique. Il est de préférence d'origine naturelle, ainsi, on retiendra de préférence un ou des polymères choisis parmi le chitosane, l'alginate, la pectine, l'amidon, la cellulose, la caséine et leurs combinaisons. Ainsi, les
30 combinaisons polymère-tensioactif ionique préférées sont celles constituées par le chitosane et la lécithine d'œuf, et l'alginate et le CTAB.

Selon une variante préférée de l'invention, la teneur du tensioactif non ionique tel que défini ci-dessus, dans la suspension, est d'au moins 15% en masse par rapport à la masse sèche des nanocapsules (m/m).

35 Un autre des objets de l'invention consiste en des nanocapsules issues du séchage de la suspension colloïdale décrite ci-dessus. Ces nanocapsules comprennent

donc au moins une fraction huileuse comprenant ou consistant en un principe actif liposoluble, un tensioactif ionique, éventuellement un tensioactif non ionique, et un polymère de préférence hydrophile, lesdites nanocapsules étant susceptibles d'être obtenues par séchage d'une suspension colloïdale de l'invention. Le séchage est
5 avantageusement réalisé en présence de lactose, les nanocapsules de l'invention étant adsorbées sur le lactose.

L'invention apporte aussi des particules comprenant des nanocapsules telles que décrites précédemment, lesdites nanocapsules étant adsorbées sur un support. Ce support peut être choisi parmi tout support inerte, comme par exemple le lactose.
10 Dans une variante préférée, ces particules sont des microparticules comprenant des nanocapsules de l'invention adsorbées sur du lactose.

Un procédé de fabrication de nanocapsules de l'invention, qu'elles soient dans une suspension colloïdale ci-dessus ou à l'état sec après traitement d'une telle suspension est encore un autre objet de l'invention.

15 Ainsi, un procédé de fabrication d'une suspension colloïdale de nanocapsules comprend les étapes suivantes :

- On dispose d'une première phase comprenant au moins une fraction huileuse comprenant ou consistant en au moins un principe actif liposoluble et un tensioactif ionique d'une part, et d'une seconde phase
20 aqueuse comprenant au moins un polymère et éventuellement un tensioactif non ionique d'autre part, la concentration molaire dudit tensioactif ionique et celle du tensioactif non ionique, le cas échéant, étant supérieures ou égales à 100 fois la concentration micellaire critique (CMC) dudit ou desdits tensioactifs ioniques et dudit ou desdits tensioactifs non
25 ioniques, respectivement ; le ou les principes actifs, tensioactifs ioniques, tensioactifs non ioniques et polymères répondant aux définitions données précédemment ;
- On forme une émulsion grossière qu'on homogénéise ensuite sous haute pression pour former la suspension colloïdale de nanocapsules.

30 La détermination de la CMC peut être effectuée par toute technique bien connue de l'homme du métier, par exemple par des mesures de tension superficielle par un tensiomètre à lame ou anneau.

Si le ou les principes actifs ne sont pas liquides à la température ambiante ou trop visqueux, les phases huileuse et aqueuse sont portées à une température variant
35 de 60 à 70°C, permettant la fusion du ou des principes actifs.

L'émulsion dite grossière est obtenue par simple agitation des phases aqueuse et huileuse. Son homogénéisation est ensuite réalisée sous haute pression, par exemple pendant au moins 6 minutes, à une pression de préférence au moins égale à 600 bar.

5 Afin d'obtenir des nanocapsules sèches selon l'invention à partir d'une suspension colloïdale de nanocapsules telle que décrite ci-dessus, on sèche par atomisation en présence de lactose lesdites nanocapsules. Ce procédé conduit à des particules qui sont non collantes et qui peuvent être conservées à température ambiante.

10 L'invention concerne aussi les utilisations de telles nanocapsules. Elles présentent un grand intérêt en nutrition animale, notamment pour les animaux monogastriques. Dans cette indication, elles sont utilisées sous forme de particules, et notamment sous forme de microparticules, telles que décrites précédemment.

 L'invention est illustrée et ses avantages mis en lumière dans les exemples
15 suivants exposant la fabrication de nanocapsules d'acétate d'alpha-tocophérol (α TAC) et leurs performances en nutrition animale dans des essais *in vitro* et *in vivo*.

 La figure 1 représente le taux de bioaccessibilité *in vitro* du TAC de différentes formulations de TAC.

 La figure 2 représente le taux d'hydrolyse *in vitro* de TAC en TOL de différentes
20 formulations de TAC.

 La figure 3 représente la concentration plasmatique en α TOL (en μ M) chez le rat après administration par gavage de différentes formulations de TAC.

 Les figures 4 et 5 représentent la concentration plasmatique en α TOL (en μ g/ml) chez le coq après administration par gavage de différentes formulations de
25 TAC.

 La figure 6 représente la concentration plasmatique en α TOL (en μ g/ml) chez le poulet après administration dans l'aliment de différentes formulations de TAC.

 Dans les exemples suivants, divers paramètres sont analysés et en particulier la biodisponibilité en vitamine E.

30 La biodisponibilité d'un principe actif liposoluble, tel que la vitamine E, ou d'un dérivé de la vitamine E est représentée par la concentration de vitamine E libérée dans le sang, par rapport à la concentration de vitamine E présente dans la ration de l'animal, ou par rapport à la concentration exprimée en équivalent de vitamine E du dérivé de vitamine E introduit dans la ration de l'animal lorsque l'on administre un
35 dérivé de la vitamine. Cette représentation de la biodisponibilité de la vitamine E

prend donc en compte l'absorption de la vitamine E ou du dérivé de la vitamine E dans l'intestin au cours du transit digestif.

Exemple 1 : Fabrication de nanocapsules selon l'invention

Formulation

Les nanocapsules préparées dans cet exemple sont identifiées par les références C24, A37 et C40.

Elles sont obtenues à partir d'une suspension colloïdale comprenant au moins :

- du TAC,
- un tensioactif ionique choisi parmi la lécithine d'œuf (Lipoid E80) et le bromure d'hexadécyl triméthylammonium (CTAB),
- pour les nanocapsules C24 et A37, un tensioactif non ionique le Lutrol®-F68,
- au moins un polymère hydrophile ionique choisi parmi le chitosane (cationique) et l'alginate de sodium (anionique),

la dite suspension colloïdale étant ensuite séchée en présence de lactose.

La formulation de ces nanoparticules figure dans le tableau 1 suivant, la teneur des ingrédients étant exprimée en % (m/m de matières sèches) :

Tableau 1

Particules		C24	A37	C40
Principe actif	TAC	24	37	39
Tensioactif ionique	Lipoid E80	12	-	10
	CTAB	-	4,5	-
Tensioactif non ionique	Lutrol®-F68	15	23	-
Polymère	Chitosane	13	-	10
	Alginate de sodium	-	8,1	
Support	Lactose	36	27,4	41

Fabrication

Le procédé de fabrication des nanoparticules compte les 3 étapes suivantes :

- préparation de la nanoémulsion,
- préparation de la suspension colloïdale de nanocapsules, et
- séchage des nanocapsules.

Protocole de fabrication des nanocapsules C24 et A37 :

Préparation de la nanoémulsion :

Pour les nanocapsules C24 :

- 5 - on disperse le tensioactif ionique, Lipoid E80, dans le TAC, sous agitation à la turbine, et on porte la dispersion à 65°C, pour obtenir une phase huileuse,
- on dissout le tensioactif non ionique (Lutrol® F68) dans l'eau, et on porte la solution à 65°C, pour obtenir une phase aqueuse,

Pour les nanocapsules A37 :

- 10 - on porte le TAC qui constitue la phase huileuse, à 65°C, et on y disperse le tensioactif ionique, CTAB,
- le tensioactif non ionique (Lutrol® F68) est dissous dans l'eau et on porte la solution à 65°C, pour obtenir une phase aqueuse,

puis pour les nanocapsules C24 et A37 :

- 15 - on ajoute la phase aqueuse à la phase huileuse sous agitation et on forme une émulsion primaire ou grossière à l'aide d'une turbine Reyneri 600 tours/min, à 65°C, pendant 15 minutes,
- on transfère l'émulsion dans l'homogénéisateur haute pression et on l'homogénéise à la pression de 600 bars pendant 6 minutes à 65°C, pour obtenir la nanoémulsion.

20 Préparation de la suspension colloïdale des nanocapsules :

- on dilue au dixième la nanoémulsion obtenue ci-dessus par une solution de Lutrol® F68,
- on ajoute la solution acétique de chitosane à 0,05 g/L pour les nanocapsules C24 ou la solution d'alginate de sodium à 1,8 g/L pour les nanocapsules A37, sous la turbine et on agite pendant 2h à température ambiante, pour obtenir une suspension colloïdale de nanocapsules, selon l'invention.

Séchage des nanocapsules :

- 30 - on sèche les nanocapsules par atomisation sur lactose ; les paramètres sont un débit de pompe de 15%, une température d'entrée de 150°C, un débit de 7 mL/min et un flux d'air comprimé de 500 L/h.

Protocole de fabrication des nanocapsules C40 :

Les nanocapsules C40 sont fabriquées selon le procédé décrit ci-dessus pour les nanocapsules C24, à l'exception du fait qu'aucun tensioactif non ionique n'est
35 ajouté.

Caractérisation des nanocapsules :

Les nanocapsules sont caractérisées par leur taille indiquée dans le tableau 2 suivant, à deux étapes du procédé de fabrication, la première à la formation de la nanoémulsion, avant l'ajout du polymère et la seconde à l'issue du procédé avant séchage des nanocapsules :

Tableau 2

Nanoparticules	C24	A37	C40
Taille des nanogouttelettes, avant ajout du polymère (nm)	219	236	123
Taille des nanocapsules avant séchage (nm)	355	342	163

Les exemples suivants illustrent l'intérêt des formulations de TAC selon l'invention par l'évaluation de la biodisponibilité du TAC.

La biodisponibilité du TAC d'une formulation correspond à la proportion de TOL absorbée par la muqueuse intestinale qui servira pour le métabolisme cellulaire et les fonctions organiques. Cette biodisponibilité est la combinaison de différents facteurs, et notamment la bioaccessibilité du TAC, c'est-à-dire la proportion de vitamine E présente dans une formulation (sous forme de TAC) qui se retrouve solubilisée dans les micelles mixtes, et l'hydrolyse du TAC en TOL par la carboxy ester hydrolase (CEH) sécrétée dans le système digestif.

Exemple 2 : Bioaccessibilité du TAC dans des formulations de TAC évaluée dans des essais *in vitro*

Ce test est décrit par Desmarchelier et al., 2013. Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 1237–1245.

Dans ces essais *in vitro*, on prépare des micelles mixtes contenant différentes formulations de TAC de l'exemple 1 qui permettent de reproduire les conditions de la digestion en imitant les micelles impliquées dans l'intestin.

La bioaccessibilité de la vitamine E est calculée après digestion *in vitro* de l'aliment contenant les différentes formulations. Elle est déterminée par le rapport entre la vitamine E dosée par HPLC se retrouvant dans la phase micellaire, et la vitamine E dosée par HPLC présente dans le digestat obtenu en fin de phase duodénale.

Les essais sont réalisés sur trois types de formulation :

- les nanocapsules C24 et A37 de l'exemple 1 : les nanocapsules A37 sont testées sous deux formes : une forme poudre avec mise sur support sur lactose (A37); et
- un produit identifié par la référence Promix, consistant en une huile de vitamine E adsorbée sur silice (Promix et Promix (2) sont deux répétitions du même produit)

Les résultats sont représentés à la Figure 1.

On observe que les nanocapsules de TAC (C24 et A37) permettent d'augmenter la bioaccessibilité de la vitamine E par rapport au produit Promix, c'est-à-dire, la quantité de vitamine E contenue dans la matrice alimentaire qui est solubilisée dans les micelles mixtes à l'issue d'une digestion *in vitro*.

Exemple 3 : Hydrolyse du TAC en TOL par la CEH dans des essais *in vitro*

Le protocole d'hydrolyse de la vitamine E-acétate (TAC) par la CEH est décrit par Desmarchelier et al., 2013. Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 1237–1245.

Brièvement, 500 µl de micelles mixtes contenant le TAC sont incubés 30 min à 37°C. De la CEH est ensuite ajoutée à une concentration de 10 U/mL pendant 30 min. L'apparition de tocophérol libre (TOL) est ensuite mesurée par HPLC.

Les essais sont réalisés sur trois types de formulation :

- les nanocapsules C24 et A37 de l'exemple 1 ; et
- un produit identifié par la référence E Promix, consistant en une huile de vitamine E.

Les résultats sont représentés à la Figure 2.

Les nanocapsules de TAC (C24 et A37) permettent d'augmenter la conversion de TAC en TOL par rapport au produit E Promix, ce qui résulte en une plus grande quantité de vitamine E disponible pour l'absorption.

Exemple 4 : Biodisponibilité du TAC dans des essais *in vivo* chez le rat

Protocole

Les essais sont réalisés sur des rats Wistar mâle âgés de 6 semaines nourris pendant 2 semaines avec un aliment carencé en tocophérol.

Les rats ont été mis à jeun la nuit précédant le gavage.

Les rats (n = 10) ont été gavés pendant 5 jours consécutifs avec 5 mg de différentes solutions de TAC dans de l'eau :

- Microvit® E Promix 50 (acétate de vitamine E adsorbé sur silice),
- Nanocapsules sèches C24 de l'exemple 1, et

- Nanocapsules sèches A37 de l'exemple 1.

Trois heures après le dernier gavage, les rats ont été anesthésiés, du sang a été prélevé par ponction intracardiaque et, après centrifugation, le plasma a été isolé. Après une double extraction hexanique, la concentration plasmatique en alpha-tocophérol (α TOL) a été mesurée par HPLC.

Résultats

Les résultats sont reportés dans la figure 3.

Le gavage avec les formulations C24 et A37 a conduit à des concentrations plasmatiques en α TOL, respectivement 26% et 24%, significativement plus élevées ($P < 0.001$) que le gavage avec le Microvit® E Promix 50.

Exemple 5: Biodisponibilité du TAC dans des essais *in vivo* chez le coq

Protocole

Le schéma expérimental est décrit en détail dans Prévéraud et al. 2015, British Poultry Science, 56 :1 ; 94–102.

Brièvement, deux salles de 60 coqs ISA Brown sont placées dans des cages individuelles. Une semaine avant l'attribution des traitements, les coqs sont alimentés avec un aliment dépourvu en vitamine E.

Les coqs ($n=10$ coqs par traitement) ont été gavés avec différentes solutions de TAC dans l'eau.

Salle 1 : Nanocapsules sèches C24 de l'exemple 1,
TOL et TAC, sous forme d'huile, à titre de témoin.

Salle 2 : Nanocapsules sèches C40 de l'exemple 1,
TOL et TAC, sous forme d'huile, à titre de témoin.

Après l'administration par gavage des produits vitamine E mis dans une gélule, des prélèvements de sang ont été fait à 0, 6, 12, 24, 48 et 96 h post gavage. Après centrifugation, le plasma est décanté et le tocophérol libre est dosé par HPLC.

Résultats

Les résultats sont illustrés aux figures 4 et 5 et reportés pour les temps à 24h et à 96h dans les tableaux 3 et 4 suivants, dans lesquels la diffusion de la vitamine E dans le sang est exprimée par l'aire sous la courbe (AUC) et le pourcentage de diffusion par rapport au TAC.

Tableau 3

Vit E (Salle 1)	24h		96h	
	AUC $\mu\text{g/ml/h}$	%/TAC	AUC $\mu\text{g/ml/h}$	%/TAC

12

TAC	206	-	597	-
TOL	307	+49%	1193	+100%
C24	228	+11%	690	+16%

Le gavage avec la formulation C24 a conduit à des concentrations plasmatiques en α TOL significativement plus élevées que le gavage avec le TAC non formulé.

5

Tableau 4

Vit E (Salle 2)	24h		96h	
	AUC $\mu\text{g/ml/h}$	%/TAC	AUC $\mu\text{g/ml/h}$	%/TAC
TAC	142	-	340	-
TOL	309	+118%	320	+124%
C40	146	+3%	719	+6%

Le gavage avec la formulation C40 a conduit à des concentrations plasmatiques en α TOL non significativement différentes de celles du témoin TAC non formulé, et préparée en l'absence d'un tensioactif non ionique, elle ne présente donc pas de
10 potentiel de biodisponibilité.

Exemple 6: Biodisponibilité du TAC dans des essais *in vivo* chez le poulet

Protocole

15 Des poulets de 1 jour nourris pendant 7 jours avec un aliment carencé en tocophérol sont mis à l'étude ; la durée totale de la phase expérimentale est fixée à 15 jours au cours de laquelle ils reçoivent différents traitements de vitamine E mélangée à l'aliment granulé (n=18 par traitement). Au préalable, les poulets ont été placés par groupe de 6 par cage. A l'âge de 21 jours, les animaux sont euthanasiés et des
20 prélèvements de foie sont réalisés. Après extraction, la vitamine E est dosée dans ce tissu.

Les poulets ont été alimentés par les formulations suivantes:

- Microvit® E Promix 50, E50 (acétate de vitamine E adsorbé sur silice),
- Nanocapsules sèches C24 de l'exemple 1.

25 Après l'administration par gavage des produits vitamine E mis dans une gélule, des prélèvements de sang ont été fait à 0, 6, 12, 24, 48 et 96 h post gavage. Après centrifugation, le plasma est décanté et le tocophérol libre est dosé par HPLC.

Résultats

Les résultats sont reportés dans la figure 6.

Le gavage avec la formulation C24 a conduit à des concentrations plasmatiques en α TOL significativement plus élevées que le gavage avec le produit E50.

- 5 L'aliment gavage avec la formulation C24 a conduit à des concentrations hépatiques en α TOL significativement plus élevées (+24%) que le régime avec la formulation E50 sur la base de la comparaison des pentes de droite de l'effet dose-réponse.

REVENDEICATIONS

1. Suspension colloïdale de nanocapsules, lesdites nanocapsules comprenant au moins une fraction huileuse comprenant ou consistant en un principe actif liposoluble et un tensioactif ionique, et un polymère hydrophile entourant ladite
5 fraction huileuse.
2. Suspension colloïdale selon la revendication 1, caractérisée en ce que les nanocapsules comprennent un tensioactif non ionique.
3. Suspension colloïdale selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit principe actif est choisi parmi la vitamine A, la vitamine D, la vitamine E, la
10 vitamine K et leurs dérivés ou leurs métabolites, les huiles essentielles, les acides gras, les huiles grasses et tout mélange de ceux-ci.
4. Suspension colloïdale selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit principe actif est choisi parmi les huiles essentielles de thym, d'origan, de romarin, d'ail, de camélia, de moutarde, de gingembre, de curcuma, de raisin, d'agrumes, de
15 sainfoin, de yucca, d'armoise, de cannelle, de menthe, de clou de girofle, de baies, de cumin et d'Echinacea.
5. Suspension colloïdale selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit tensioactif ionique présente un poids moléculaire d'au plus 1500 g/mol, de préférence d'au plus 1000 g/mol.
- 20 6. Suspension colloïdale selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le tensioactif ionique est choisi parmi les phosphatidylcholines, telles que la lécithine d'œuf ou la lécithine de soja, ou le bromure d'hexadécyl triméthylammonium.
7. Suspension colloïdale selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisée en ce que ledit tensioactif non ionique est choisi parmi les copolymères à
25 blocs polyoxyéthylène-polyoxypropylène, les mélange de copolymères à blocs polyoxyéthylène (EO)-polyoxypropylène (PO), le Tween 80, les esters d'acides gras et de saccharose, et tout mélange de ceux-ci.
8. Suspension colloïdale selon la revendication 7, caractérisé en ce que le ou
30 les copolymères à blocs polyoxyéthylène-polyoxypropylène sont choisis parmi les copolymères de formule $EO_x-PO_y-EO_x$ dans laquelle x varie de 75 à 85 et y varie de 25 à 35, les copolymères de formule $EO_x-PO_y-EO_x$ dans laquelle x varie de 55 à 65 et y varie de 35 à 45 et les copolymères de formule $EO_x-PO_y-EO_x$ dans laquelle x varie de 112 à 123 et y varie de 40 à 50.
- 35 9. Suspension colloïdale selon la revendication 7, caractérisée en ce que les esters d'acides gras et de saccharose sont choisis parmi les stéarates et les palmitates.

10. Suspension colloïdale selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit polymère est choisi parmi le chitosane, l'alginate, la pectine, l'amidon, la cellulose, la caséine et leurs combinaisons.

5 11. Suspension colloïdale selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la teneur en dit principe actif est d'au moins 5% en masse par rapport à la masse sèche des nanocapsules, de préférence d'au moins 25%, et mieux encore d'au moins 50%.

10 12. Suspension colloïdale selon l'une quelconque des revendications 2 à 11, caractérisée en ce que la teneur en dit tensioactif non ionique est d'au moins 15% en masse par rapport à la masse sèche des nanocapsules.

15 13. Nanocapsules comprenant au moins un principe actif sous forme d'une huile, un tensioactif ionique, éventuellement un tensioactif non ionique, et un polymère hydrophile, lesdites nanocapsules étant susceptibles d'être obtenues par séchage d'une suspension colloïdale selon l'une quelconque des revendications précédentes.

14. Nanocapsules selon la revendication 13, adsorbées sur du lactose.

15. Microparticules comprenant des nanocapsules selon la revendication 13 et du lactose.

20 16. Procédé de fabrication d'une suspension colloïdale selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, comprenant les étapes suivantes :

- 25 - On dispose d'une première phase comprenant au moins ladite fraction huileuse comprenant ou consistant en ledit principe actif liposoluble et le tensioactif ionique d'une part, et d'une seconde phase aqueuse comprenant au moins le polymère et éventuellement ledit tensioactif non ionique, d'autre part, la concentration molaire dudit tensioactif ionique et celle du tensioactif non ionique étant respectivement supérieures ou égales à 100 fois la concentration micellaire critique (CMC) dudit tensioactif ; et
- 30 - On forme une émulsion grossière qu'on homogénéise ensuite sous haute pression pour former la suspension colloïdale de nanocapsules.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que les première et seconde phases sont à une température variant de 60 à 70°C.

35 18. Procédé de fabrication de nanocapsules selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'on prépare une suspension colloïdale de nanocapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 en mettant en œuvre le procédé selon la

revendication 16 ou 17, puis on sèche par atomisation en présence de lactose lesdites nanocapsules.

19. Utilisation des nanocapsules selon la revendication 13 ou des microparticules selon la revendication 15, en nutrition animale.

5 20. Utilisation selon la revendication 19, destinée aux monogastriques.

FIGURE 1

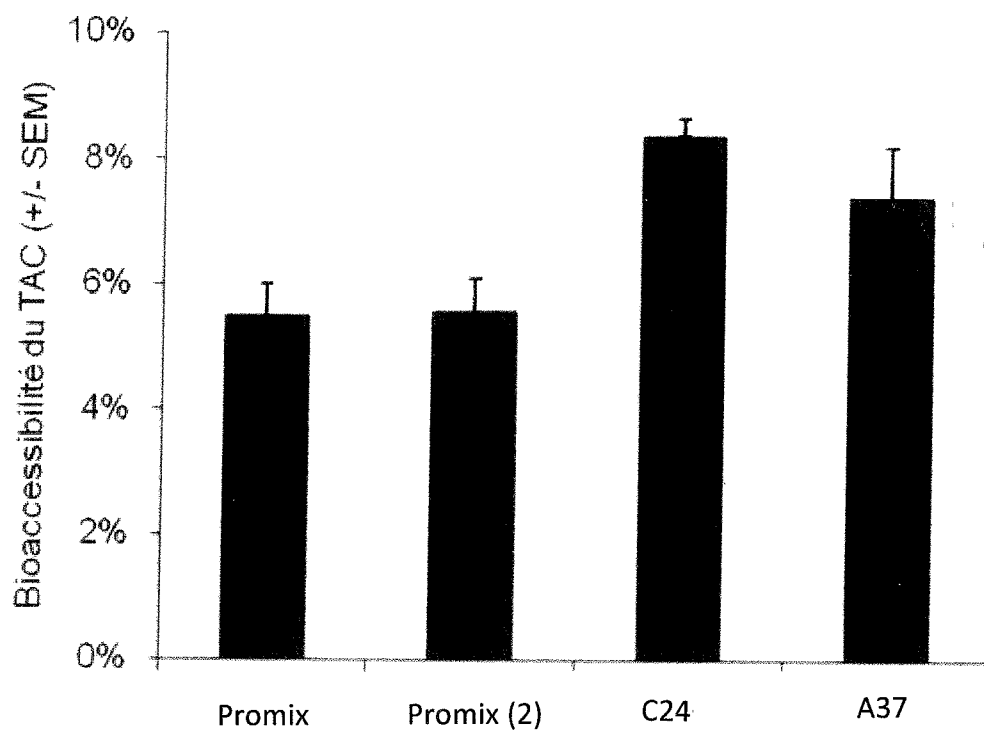


FIGURE 2

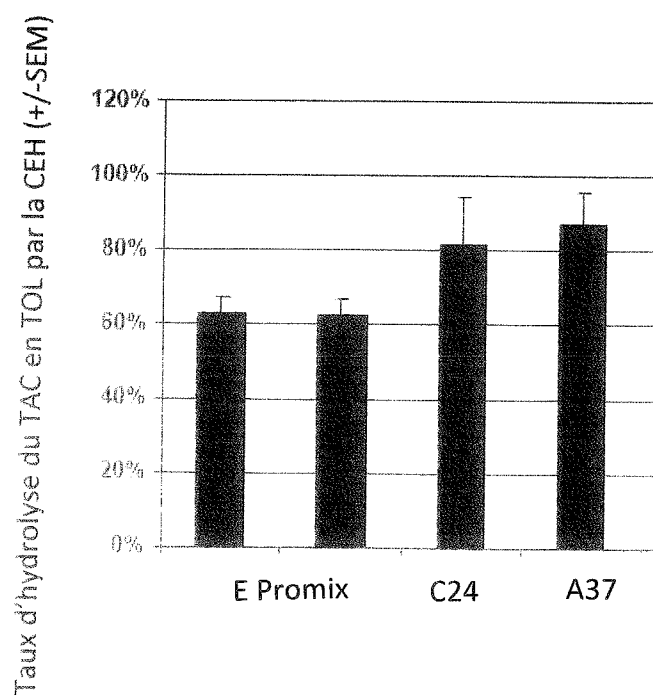


FIGURE 3

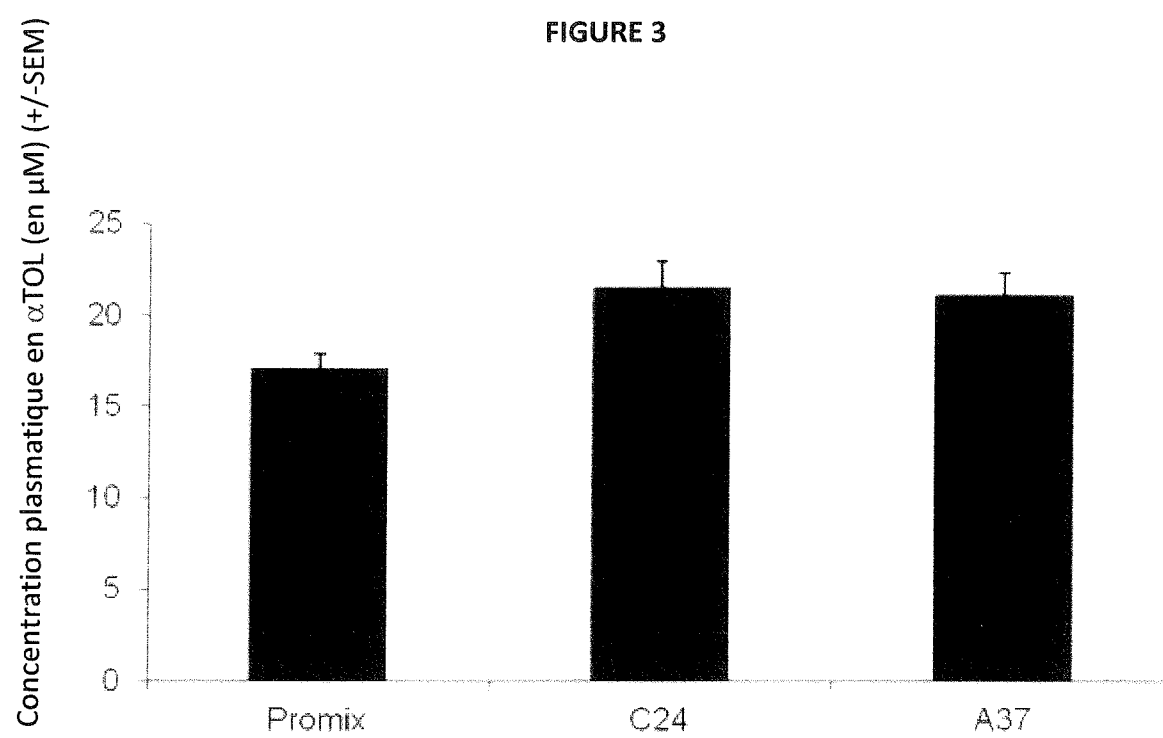


FIGURE 4

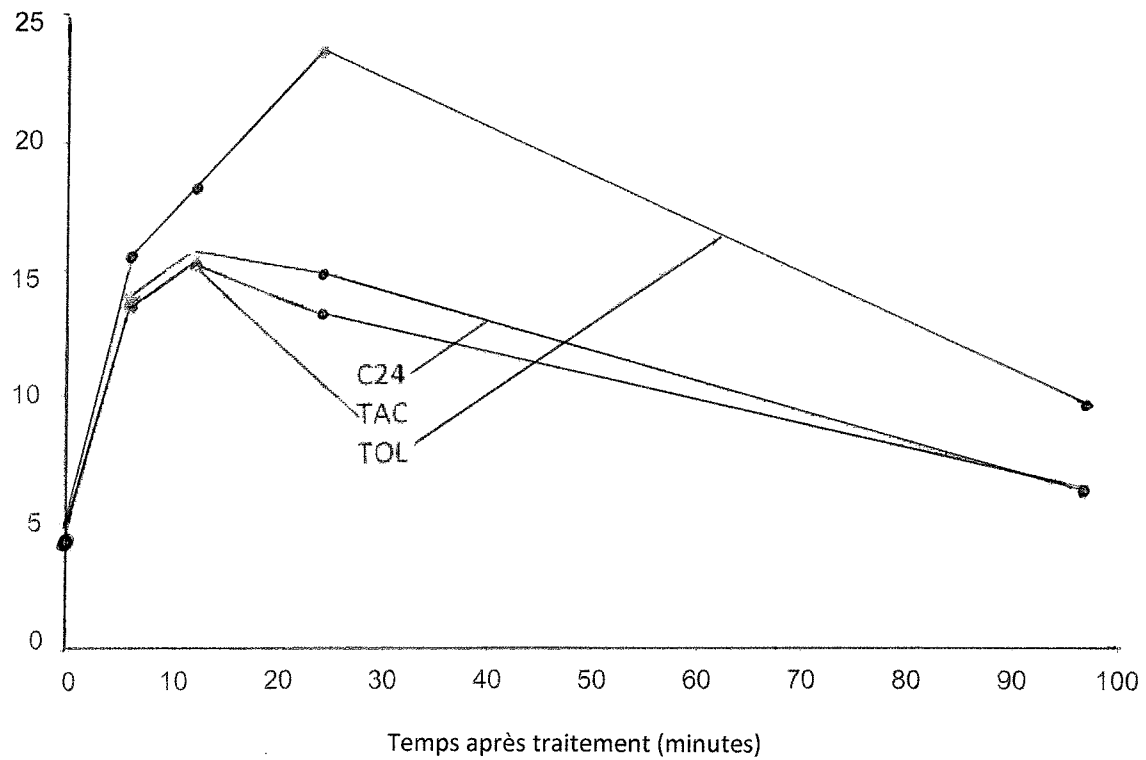
Concentration plasmatique en α TOL en $\mu\text{g/ml}$ (+/-SEM)

FIGURE 5

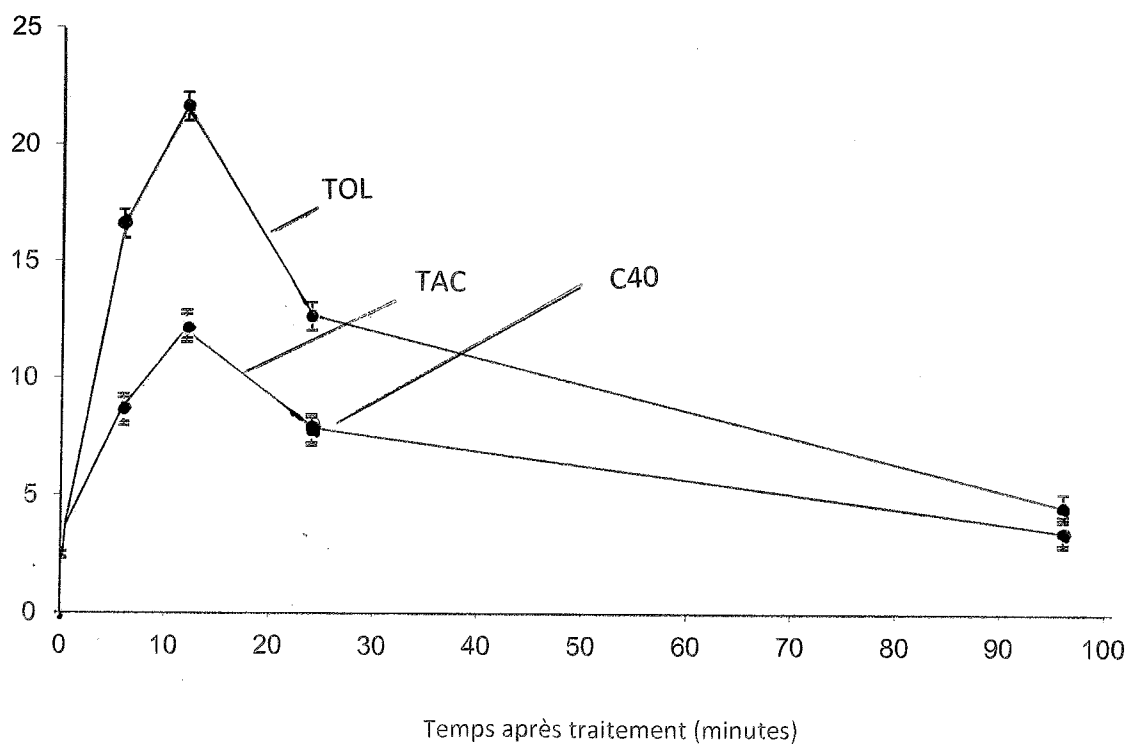
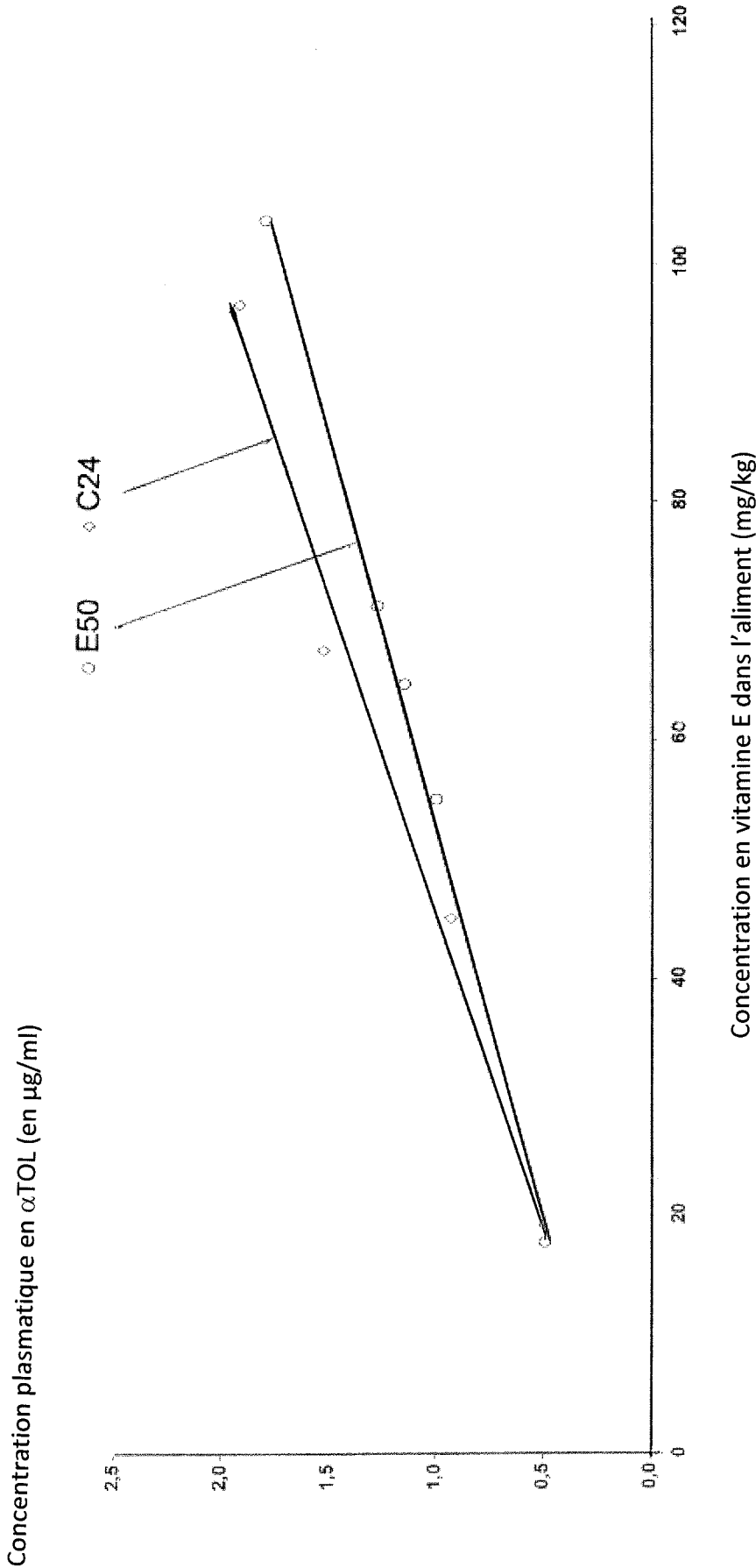
Concentration plasmatique en α TOL en $\mu\text{g/ml}$ (+/-SEM)

FIGURE 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2017/050622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23K40/30 A61K9/51
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)
A23K A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 552 820 A1 (OREAL [FR]) 13 July 2005 (2005-07-13) abstract paragraphs [0017], [0018], [0020], [0026], [0029], [0030], [0034], [0036], [0039], [0040], [0046], [0053], [0058] examples 1-5 claims 1-29	1-20
X	FR 2 924 943 A1 (GALDERMA SA [CH]) 19 June 2009 (2009-06-19) abstract page 1 examples 1-4 claims 1,11,16 ----- -/-	1-12,16, 17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 May 2017

Date of mailing of the international search report

31/05/2017

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

de La Tour, Camille

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2017/050622

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 018 363 A1 (OREAL [FR]) 12 July 2000 (2000-07-12) abstract paragraph [0015] claims 1-27 -----	1-16
A	FR 2 803 203 A1 (FOURNIER IND & SANTE [FR]) 6 July 2001 (2001-07-06) pages 5-7 examples 1-8 claim 1 -----	1-16
A	WO 2010/040194 A2 (BIOLAB SANUS FARMACEUTICA LTDA [BR]; UNIV FED DO RIO GRANDE DO SUL [BR]) 15 April 2010 (2010-04-15) pages 8-11 example 14 -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2017/050622

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1552820	A1	13-07-2005	AT 416760 T 15-12-2008
		EP 1552820 A1	13-07-2005
		ES 2317173 T3	16-04-2009
		FR 2864900 A1	15-07-2005
		JP 2005248162 A	15-09-2005

FR 2924943	A1	19-06-2009	NONE

EP 1018363	A1	12-07-2000	AT 199840 T 15-04-2001
		DE 69900065 D1	26-04-2001
		DE 69900065 T2	19-07-2001
		EP 1018363 A1	12-07-2000
		ES 2157685 T3	16-08-2001
		FR 2788007 A1	07-07-2000
		JP 2000198711 A	18-07-2000
		KR 20000052462 A	25-08-2000
		US 2002015721 A1	07-02-2002

FR 2803203	A1	06-07-2001	AT 276741 T 15-10-2004
		AU 3030801 A	16-07-2001
		DE 60014162 D1	28-10-2004
		DE 60014162 T2	22-09-2005
		EP 1242047 A1	25-09-2002
		ES 2226976 T3	01-04-2005
		FR 2803203 A1	06-07-2001
		US 2003082215 A1	01-05-2003
		WO 0149262 A1	12-07-2001

WO 2010040194	A2	15-04-2010	AR 073816 A1 01-12-2010
		AU 2009301652 A1	15-04-2010
		BR PI0805854 A2	24-08-2010
		CA 2740080 A1	15-04-2010
		CO 6382104 A2	15-02-2012
		EP 2344119 A2	20-07-2011
		US 2011262531 A1	27-10-2011
		US 2016256372 A1	08-09-2016
		WO 2010040194 A2	15-04-2010
		ZA 201103285 B	30-05-2012

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/050622

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A23K40/30 A61K9/51 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) A23K A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 1 552 820 A1 (OREAL [FR]) 13 juillet 2005 (2005-07-13) abrégé alinéas [0017], [0018], [0020], [0026], [0029], [0030], [0034], [0036], [0039], [0040], [0046], [0053], [0058] exemples 1-5 revendications 1-29	1-20
X	FR 2 924 943 A1 (GALDERMA SA [CH]) 19 juin 2009 (2009-06-19) abrégé page 1 exemples 1-4 revendications 1,11,16 <div style="text-align: center;">-----</div> <div style="text-align: center;">-/-</div>	1-12,16, 17
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">12 mai 2017</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">31/05/2017</div>
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 <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">de La Tour, Camille</div>

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	EP 1 018 363 A1 (OREAL [FR]) 12 juillet 2000 (2000-07-12) abrégé alinéa [0015] revendications 1-27 -----	1-16
A	FR 2 803 203 A1 (FOURNIER IND & SANTE [FR]) 6 juillet 2001 (2001-07-06) pages 5-7 exemples 1-8 revendication 1 -----	1-16
A	WO 2010/040194 A2 (BIOLAB SANUS FARMACEUTICA LTDA [BR]; UNIV FED DO RIO GRANDE DO SUL [BR]) 15 avril 2010 (2010-04-15) pages 8-11 exemple 14 -----	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2017/050622

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1552820	A1	13-07-2005	AT 416760 T	15-12-2008
			EP 1552820 A1	13-07-2005
			ES 2317173 T3	16-04-2009
			FR 2864900 A1	15-07-2005
			JP 2005248162 A	15-09-2005

FR 2924943	A1	19-06-2009	AUCUN	

EP 1018363	A1	12-07-2000	AT 199840 T	15-04-2001
			DE 69900065 D1	26-04-2001
			DE 69900065 T2	19-07-2001
			EP 1018363 A1	12-07-2000
			ES 2157685 T3	16-08-2001
			FR 2788007 A1	07-07-2000
			JP 2000198711 A	18-07-2000
			KR 20000052462 A	25-08-2000
			US 2002015721 A1	07-02-2002

FR 2803203	A1	06-07-2001	AT 276741 T	15-10-2004
			AU 3030801 A	16-07-2001
			DE 60014162 D1	28-10-2004
			DE 60014162 T2	22-09-2005
			EP 1242047 A1	25-09-2002
			ES 2226976 T3	01-04-2005
			FR 2803203 A1	06-07-2001
			US 2003082215 A1	01-05-2003
			WO 0149262 A1	12-07-2001

WO 2010040194	A2	15-04-2010	AR 073816 A1	01-12-2010
			AU 2009301652 A1	15-04-2010
			BR PI0805854 A2	24-08-2010
			CA 2740080 A1	15-04-2010
			CO 6382104 A2	15-02-2012
			EP 2344119 A2	20-07-2011
			US 2011262531 A1	27-10-2011
			US 2016256372 A1	08-09-2016
			WO 2010040194 A2	15-04-2010
			ZA 201103285 B	30-05-2012
