

(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
18 janvier 2007 (18.01.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/007014 A2

(51) Classification internationale des brevets : **Non classée**

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/050712

(22) Date de dépôt international : 12 juillet 2006 (12.07.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0507439 12 juillet 2005 (12.07.2005) FR

(71) **Déposants** (pour tous les États désignés sauf US) : **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I** [FR/FR]; 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)** [FR/FR]; 3 rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) **Inventeurs; et**

(75) **Inventeurs/Déposants** (pour US seulement) : **DOMARD, Alain** [FR/FR]; 74 Boulevard des Belges, F-69006 Lyon (FR). **VITON, Christophe** [FR/FR]; 20 Rue Alexis Peroncel, F-69100 Villeurbanne (FR). **LAMARQUE, Guillaume** [FR/FR]; 11 Avenue Roberto Rossellini, F-69100 Villeurbanne (FR).

(74) **Mandataire** : **LE CACHEUX, Samuel**; Cabinet Beau de Loménie, 51 Avenue Jean Jaures, BP 7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).

(81) **États désignés** (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, 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, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

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

(54) **Title:** NOVEL METHOD FOR PREPARING CHITIN NANOPARTICLES

(54) **Titre :** NOUVEAU PROCEDE DE PREPARATION DE NANOPARTICULES DE CHITINE

(57) **Abstract:** The invention concerns a method for preparing chitin nanoparticles wherein copolymer chains of glucosamine and of N-acetyl-D-glucosamine bound by a β ,(1 $\rightarrow$ 4) bond, having an average degree of acetylation DA not less than 50 % and an average degree of weight polymerization DP_w not less than 1500, are dispersed at a concentration C not less than the entangling concentration C^* of the copolymer chains, in an aqueous solution with pH ranging between 1 and 8, said solution being obtained by mixing in aqueous solution an acid and a salt.

(57) **Abrégé :** Procédé de préparation de nanoparticules de chitine dans lequel des chaînes copolymère de glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liés par une liaison β ,(1 $\rightarrow$ 4), qui présentent un degré moyen d'acétylation DA supérieur ou égal à 50 % et un degré de polymérisation moyen en poids DP_w supérieur ou égal à 1500, sont dispersées à une concentration C au moins égale à la concentration C^* d'enchevêtrement des chaînes copolymères, dans une solution aqueuse dont le pH est compris entre 1 et 8, la dite solution étant obtenue par mélange en solution aqueuse d'un acide et d'un sel.

WO 2007/007014 A2

NOUVEAU PROCEDE DE PREPARATION DE NANOPARTICULES DE CHITINE

La présente invention a pour objet un nouveau procédé de préparation de nanoparticules de chitine, ainsi que les nanoparticules susceptibles d'être
5 obtenues par un tel procédé.

La vectorisation de principes actifs est une technique qui a pris un essor considérable et fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années, aboutissant à la conception de diverses formes de particules colloïdales, associant une molécule active et un support. Dans le domaine médical,
10 l'utilisation de vecteurs médicamenteux présente l'avantage de pouvoir intervenir sur le processus de distribution du principe actif dans l'organisme et d'en augmenter l'efficacité. La molécule à activité pharmaceutique portée par le matériau support peut être orientée spécifiquement vers la cible à traiter ou sa concentration est alors localement élevée. L'efficacité est ainsi
15 accrue, tout en diminuant les doses nécessaires et par là aussi les risques d'effet secondaire par imprégnation d'autres organes.

Différents types de vecteurs colloïdaux ont été développés, on peut citer les nanoparticules, les nanocapsules, les liposomes...

Les biopolymères, tel que le chitosane, présentent des propriétés
20 biologiques intéressantes et sont utilisés dans diverses applications, comme l'encapsulation de principe actif permettant d'obtenir une libération contrôlée, et également d'améliorer la biodisponibilité de certaines drogues. (U. Gaur *et al.* *Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier*, Journal of controlled release 72, 317-323, 2001; C. L. Bell et N. A. Peppas, *Modulation of drug permeation through interpolymers complexed hydrogels for drug delivery applications*, Journal of controlled release 39, 201-207, 1996).

Le chitosane est une fibre d'origine naturelle biodégradable et biorésorbable, obtenue après désacétylation de la chitine. La chitine est un
30 biopolymère de haut poids moléculaire, non toxique, biodégradable et

biorésorbable, et c'est avec la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature.

La chitine est constituée d'une chaîne co-polymère linéaire dont la structure contient des monomères de type glucosamine (GlcN) et des
5 monomères N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) liés par une liaison β , (1→4). L'extraction de la chitine à partir de carapace de crustacés et/ou d'endosquelettes de calamars, se fait usuellement par voie chimique, puis la transformation par désacétylation de la chitine dans de la soude concentrée permet d'obtenir du chitosane. Le chitosane est donc obtenu en enlevant
10 suffisamment de groupements acétyles pour permettre à la macromolécule d'être soluble dans la plupart des acides dilués.

Il n'existe pas, à ce jour, de nomenclature officielle différenciant la chitine du chitosane en fonction de son DA. Il est cependant admis que le chitosane est défini comme un copolymère d'unités de répétition GlcNAc et
15 GlcN soluble dans des solutions aqueuses dans des conditions stoechiométriques ou avec un léger excès d'acide (par exemple, un excès de 10 % en acide par rapport aux unités GlcN est utilisé) lorsque la chitine ne sera soluble que dans le diméthylacétamide (DMAc) contenant 5 ou 8 % de LiCl (Terbojevich M. *et al.* dans Carbohydr. Res. **1988**, 180, 73-86 ou dans
20 Adv. Chitin Sci. Domard A. *et al.* - G.A.F. Eds. **1996**, 1, 333-339). ou la *N*-méthylpyrrolidone (NMP) (Austin P.R. *et al.* Chitin and Chitosan, Skjak-Braek *et al.* - P. Eds. **1989**, 749-755). La condition de solubilité du chitosane est satisfaite dans la plupart des cas pour des DA < 40 %. Cependant, le DA critique où le chitosane devient soluble dans l'eau faiblement acide dépend
25 de nombreux paramètres comme son degré de polymérisation moyen en masse (DP_w), son pK intrinsèque (pK_0) (Sorlier P. *et al.* Biomacromol. **2001**, 2, 765-772) le pH et la force ionique (Anthonsen M. *et al.* Carbohydr. Polym. **1994**, 25, 13-23) de la solution, mais surtout du procédé d'obtention du copolymère (Sannan T. *et al.* dans Makromol. Chem. **1975**, 176, 1191-1195
30 ou dans Makromol. Chem. **1976**, 177, 3589-3600 ; Ottoy M.H. *et al.* Carbohydr. Polym. **1996**, 29, 17-24). Si la réaction de désacétylation de la

chitine en chitosane permet de solubiliser le copolymère pour un DA inférieur ou égal à 40 % environ, la réacétylation (réaction inverse de la précédente) du chitosane en chitine ne reprécipite le copolymère que pour un DA supérieur à 77%. Cette différence de solubilité vient, entre autre, du fait que
5 la désacétylation de la chitine, préparée en milieu hétérogène, mène à un copolymère à longues séquences d'unités GlcNAc et GlcN, alors que la réacétylation du chitosane aboutit à un copolymère statistique.

Dans la suite de la description, on nommera indifféremment chitine ou chitosane un copolymère de glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liées
10 par une liaison β , (1 $\rightarrow$ 4).

De par sa structure chimique intrinsèque, une nanoparticule à base de chitine est parfaitement compatible avec les milieux biologiques et sa haute tolérance biologique est connue depuis longtemps, ce qui en fait donc un matériau de prédilection pour la constitution de vecteurs de principes actifs,
15 notamment, dans le domaine thérapeutique, diagnostique, agroalimentaire et cosmétique.

Il existe différents procédés de préparation de nanoparticules de chitine. Ces procédés font généralement appel à l'utilisation d'un coréactif. On peut citer des procédés de gélification ionique avec du TPP, de
20 complexation avec un polyanion comme l'ADN ou des métaux. Il est également possible d'opérer par réticulation à l'aide d'un polymère synthétique. Par ailleurs, quelques publications récentes ont étudié la formation d'agrégats de chitosane avec le chitosane seul.

Tout d'abord, la conformation des agrégats formés avec le chitosane
25 seul en solution, par microscopie électronique à transmission (MET) et diffusion de la lumière statique a été étudiée dans une publication de Carbohydr.Polym. **1994**, 25, 13-23. Les objets formés sont en forme de bâtonnets et sont très disperses en taille. Plus récemment, les inventeurs de la présente demande de brevet se sont intéressés dans Biomacromol. **2003**,
30 4, 641-648 au comportement en solution du chitosane en fonction de son DA et pour un DP unique de 1000.

Dans Langmuir, **2003**, 19(23), 9896-9903, les inventeurs ont utilisé différents chitosanes de $DP_w = 1\ 000$ et de DA différents, qui sont solubilisés en solution dans des conditions légèrement acides. La solution est ensuite neutralisée à l'aide d'une base jusqu'à un pH critique par lequel la solution
5 commence à précipiter, pour former des coacervats qui ne sont stables que pour une fenêtre de pH très restreint. De plus, avec cette méthode, il est impossible de concentrer les solutions obtenues, afin d'atteindre des taux de solide importants.

Enfin, les inventeurs ont étudié dans Biomacromolecules **2005**, 6, 131-
10 142, dans un tampon d'acétate de sodium à pH = 4,5, les propriétés physicochimiques de 4 séries différentes de chitosane avec des degrés d'acétylation (DA) et des degrés de polymérisation moyen en poids (DP_w) variant respectivement entre 0 et 70 % et entre 650 et 2600.

Jusqu'à présent, aucun de ces travaux n'a permis d'aboutir à un
15 procédé de préparation de nanoparticules de chitine sphériques qui soit simple, économique et facilement industrialisable et qui, de plus, conduise à une stabilité améliorée des nanoparticules formées, et ce sans ajout de co-réactif.

C'est justement un des objectifs que se propose d'atteindre la présente
20 invention.

Dans ce contexte, la présente invention a pour objet un procédé de préparation de nanoparticules de chitine dans lequel des chaînes copolymère de glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liées par une liaison $\beta_1(1\rightarrow4)$, qui présentent un degré moyen d'acétylation DA supérieur ou égal à 50 % et
25 un degré de polymérisation moyen en poids DP_w supérieur ou égal à 1500, sont dispersées à une concentration C au moins égale à la concentration C^* d'enchevêtrement des chaînes copolymères, dans une solution aqueuse dont le pH est compris entre 1 et 8, ladite solution aqueuse étant obtenue par mélange en solution aqueuse d'un acide et d'un sel.

Selon des variantes préférées de l'invention, le dit procédé présente une ou plusieurs des caractéristiques techniques suivantes prises en combinaison, lorsqu'elles ne s'excluent pas l'une l'autre :

- 5
 - l'acide est choisi parmi l'acide chlorhydrique, l'acide perchlorique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide chloroacétique, l'acide citrique, l'acide picrique, l'acide ascorbique et les acides gras comprenant jusqu'à 12 atomes de carbone ; l'acide acétique est préférentiellement utilisé,
- 10
 - le sel est choisi parmi les sels des acides énoncés ci-dessus ; l'acétate d'ammonium est préférentiellement utilisé,
 - la solution aqueuse contient de 0,05 à 5 mol/L de sel, de préférence de 0,1 à 0,5 mol/L de sel,
 - la solution aqueuse présente un pH compris dans la gamme allant de 2 à 7,5, de préférence dans la gamme allant de 4,5 à 7,5,
- 15
 - les chaînes de copolymères sont statistiques,
 - les chaînes de copolymères présentent un indice de polymolécularité **I_p** inférieur à 2, de préférence inférieur à 1,6 et préférentiellement inférieur à 1,3,
- 20
 - la concentration C est comprise dans la gamme allant de 5 fois **C^*** à 10 fois **C^*** ,
 - la concentration C est comprise dans la gamme allant de 6 fois **C^*** à 7 fois **C^*** ,
 - la concentration C est inférieure ou égale à 7 fois **C^*** , l'apparition de nanoparticules se faisant alors spontanément,
- 25
 - après apparition de nanoparticules, la concentration C en copolymère est abaissée par dilution,
 - la concentration C est supérieure à 7 fois **C^*** et après apparition d'un gel ou de nanoparticules, la concentration C en copolymère est abaissée par dilution,
- 30
 - la dilution est choisie de façon à ajuster la taille des nanoparticules,

- les nanoparticules formées présentent un diamètre moyen compris entre 50 nm et 1 μ m.

La présente invention a également pour objet des nanoparticules susceptibles d'être obtenues selon le procédé ci-dessus défini, ainsi que des
5 vecteurs de molécules d'intérêt biologique comportant de telles nanoparticules en association avec au moins une molécule d'intérêt biologique.

Avant de décrire plus en détails l'invention, certaines définitions des termes employés vont être rappelées.

10 Dans le cadre de l'invention, on nommera nanoparticules de chitine, des objets sphériques de taille nanométrique formés d'une association de chaînes copolymères de glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liés par une liaison β , (1 $\rightarrow$ 4). Ces nanoparticules sont solvatées en solution aqueuse et
15 présentent un diamètre moyen, par exemple, compris entre 50 nanomètres et 1 micromètre, et de préférence compris entre 200 et 400 nanomètres.

Le degré d'acétylation d'un copolymère de chitine est la fraction molaire $\times 100$ des unités GlcNAc sur le nombre total d'unités GlcN et GlcNAc. Les DA peuvent être déterminés par spectroscopie RMN¹H comme décrit par Hirai *et al. Polym. Bull.* **1991**, 26, 87.

20 Les degrés moyens de polymérisation en poids DP_w des copolymères de chitine sont déterminés par diffusion de la lumière en mode batch comme décrit dans *Biomacromolecules*, **2005**, 6(1), page 133, en utilisant les valeurs du rapport dn/dc comme décrit par Schatz *et al. Biomacromolecules*, **2003**, 4, 641.

25 La concentration C* d'enchevêtrement des chaînes copolymères peut être définie comme la concentration à partir de laquelle les chaînes copolymères ne sont plus isolées en solution. Cette concentration est déterminée selon la méthode décrite dans la publication *Biomacromolecules*, **2005**, 6(1) 133, à l'aide d'un viscosimètre capillaire (du type Ubbelohde
30 automatique présentant un diamètre interne de 0,53 mm) ou un viscosimètre dynamique, en considérant que C* correspond à 1/viscosité intrinsèque.

La description qui suit, en référence aux figures annexées, permet de mieux comprendre l'invention.

Les **figures 1 à 3** sont des vues au microscope électronique à transmission de nanoparticules obtenues selon le procédé de l'invention.

5 La **figure 1** montre des vues de nanoparticules obtenues dans les mêmes conditions, avec un copolymère de chitine de DA = 50% et de $DP_w = 2600$ (image de gauche), et avec un copolymère de chitine de DA = 70% et de $DP_w = 2600$ (image de droite).

10 La **figure 2** montre, des vues de nanoparticules obtenues dans les mêmes conditions, avec un copolymère de chitine de DA = 70% et de $DP_w = 2200$ (image de gauche), et avec un copolymère de chitine de DA = 70% et de $DP_w = 2600$ (image de droite).

15 La **figure 3** montre l'influence de la concentration C en copolymère de chitine. L'image de gauche montre les nanoparticules obtenues avec une concentration C supérieure à C^* . Les images suivantes montrent l'évolution des nanoparticules quand, une fois les nanoparticules de l'image de gauche obtenue, on abaisse la concentration C, par addition de solvant, pour obtenir une concentration inférieure à C^* .

20 Selon une des caractéristiques essentielles de l'invention, le copolymère de chitine doit être dispersé à une concentration supérieure à sa concentration C^* d'enchevêtrement. Une fois les nanoparticules formées, il est alors possible de diminuer cette concentration.

25 Le procédé selon l'invention est extrêmement simple puisqu'il consiste à disperser des chaînes copolymère de glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liés par une liaison $\beta_1(1\rightarrow4)$ de DA et DP particulier dans une solution aqueuse, en particulier dans une solution aqueuse tamponnée d'acide acétique et d'acétate d'ammonium, par exemple constituée d'acide acétique 0,2 M et d'acétate d'ammonium 0,15 M. Contrairement aux techniques de l'art antérieur, aucun co-réactif n'est utilisé pour la formation
30 des nanoparticules. Le copolymère de chitine mis en œuvre doit remplir les conditions suivantes :

- il doit présenter un degré moyen d'acétylation DA supérieur ou égal à 50 %. Ce paramètre joue non seulement sur la sphéricité des particules qui perdent de leur sphéricité pour des DA plus faibles, mais également, à moindre échelle, sur la taille des nanoparticules qui sont plus petites pour des DA plus faibles, comme illustré **figure 1**,
- Le degré de polymérisation moyen DP_w des chaînes de copolymère doit être supérieur ou égal à 1 500, et de préférence supérieur ou égal à 1 600. Ce paramètre joue non seulement sur la sphéricité des particules, qui sont moins sphériques pour des DP plus faibles, mais également, à moindre échelle, sur leur taille qui diminue pour des DP faibles comme illustré **figure 2**,
- Le copolymère utilisé est de préférence statistique, ce qui favorise la solubilité des copolymères pour les DA et DP élevés tels que définis ci-dessus.

La concentration en copolymères au sein de la solution est également un paramètre extrêmement important. Le polymère doit être très concentré lors de la solubilisation/dispersion, et il est introduit dans la solution aqueuse avec une concentration supérieure à sa concentration critique d'enchevêtrement C^* .

Lorsque la concentration de solubilisation du polymère est très concentrée, les objets obtenus perdent en sphéricité et présentent des tailles importantes et sont disperses en taille. Une fois les nanoparticules formées, il est alors possible d'abaisser la concentration, voire en dessous de la concentration C^* , en ajoutant de la solution aqueuse pour obtenir alors des nanoparticules parfaitement sphériques de plus petite taille et pratiquement monodisperses. Par contre, si l'on opère à des concentrations initiales inférieures à la concentration C^* , il est quasi impossible de former des nanoparticules. L'influence de la dissolution sur la taille des particules obtenues est présentée **figure 3**.

La solution dans laquelle le copolymère est dissout est une solution aqueuse de pH compris entre 1 et 8. Cette solution pourra être une solution tamponnée. L'acide permettant d'obtenir la solution aqueuse est, par exemple, choisi parmi l'acide chlorhydrique, l'acide perchlorique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide chloroacétique, l'acide citrique, l'acide picrique, l'acide ascorbique et les acides gras comprenant jusqu'à 12 atomes de carbone ; l'acide acétique est préférentiellement utilisé. En tant que sel, on peut notamment utiliser les sels des acides susmentionnés, tel que l'acétate d'ammonium. En particulier, on utilisera un couple acide/sel correspondant. Avantageusement, l'acide acétique et l'acétate d'ammonium seront préférentiellement utilisés. Le sel est introduit de façon à obtenir au final dans la solution aqueuse de 0,05 à 5 mol/L de sel, de préférence de 0,1 à 0,5 mol/L de sel. Par ailleurs, la solution aqueuse présente un pH compris dans la gamme allant de 1 à 8, avantageusement, un pH compris dans la gamme allant de 2 à 7,5, de préférence dans la gamme allant de 4,5 à 7,5. Une solution tampon d'acétate d'ammonium et d'acide acétique de pH 4,5 environ est préférentiellement mise en œuvre.

La dispersion des chaînes de copolymères de chitine dans la solution aqueuse est généralement obtenue sous agitation vive, par exemple, au moyen de tout moyen mécanique approprié, avantageusement avec une vitesse de 1000 à 2000 rpm.

On assiste, tout d'abord à une solubilisation des chaînes de copolymère, mais très rapidement, les nanoparticules se forment, le plus souvent, de manière spontanée. Pour les concentrations très élevées en copolymère, un gel est formé au lieu des nanoparticules, notamment pour des systèmes très concentrés dont la concentration est supérieure à 7 fois C^* . Il est alors possible de diluer l'échantillon à des concentrations plus faibles, de façon à former des nanoparticules. Une fois le gel ou les nanoparticules formées, la concentration en polymère ne joue un rôle que sur la taille, la forme et le nombre des nanoparticules formées. Par conséquent, il est possible de solubiliser un chitosane de DA 70 %, de DP de

1 600 à une concentration de $9C^*$ pour former un gel, puis de le diluer pour former des nanoparticules, par exemple à une concentration égale à 5 fois C^* , puis de redescendre encore cette concentration pour arriver à former des nanoparticules plus petites, plus sphériques et moins disperses en taille
5 jusqu'à une concentration inférieure à C^* . Pour des concentrations finales correspondant à $0,1 C^*$, on peut atteindre des particules de taille très petites, par exemple de l'ordre de 50 nm.

Une fois les nanoparticules formées, il est également possible de diminuer la force ionique de la solution, par exemple jusqu'à 0,01 mol/L de
10 sel, avec le même sel, ou bien il est également possible de changer de sel et d'utiliser du NaCl par exemple, notamment par transfert de solvant avec une cellule d'ultrafiltration. Ces variations ont une influence sur la taille, le nombre et la forme des nanoparticules finales obtenues.

Par ailleurs, les nanoparticules formées sont stables dans le temps,
15 dans le solvant de formation. Il est possible également de les concentrer par ultrafiltration sans qu'elles collapsent et il est également possible de les centrifuger et de les redisperser. De façon avantageuse, les nanoparticules obtenues sont isodisperses en diamètre, c'est-à-dire que la distribution en taille d'un ensemble de nanoparticules obtenue par diffusion laser dynamique
20 est très resserrée. Notamment, on obtiendra une dispersion de nanoparticules dans laquelle au moins 90% des particules ont un diamètre compris entre le diamètre moyen d_{50} (diamètre en dessous duquel on trouve 50% de la masse des particules) de la dispersion, plus ou moins 20% du d_{50} .

Les nanoparticules de chitine selon l'invention peuvent comporter une
25 ou plusieurs molécules d'intérêt biologique. Les molécules d'intérêt biologique peuvent être complexées en surface de la nanoparticule ou piégées dans cette dernière. L'association de la molécule d'intérêt biologique aux chaînes copolymères se fait, par exemple, par force de Van der Waals ou interaction ionique. La ou les molécules d'intérêt biologique peuvent donc
30 être introduites soit sur les nanoparticules déjà formées, soit lors de leur préparation. Il est par exemple possible de disperser les chaînes de

copolymères dans une solution contenant déjà une molécule d'intérêt biologique.

Les particules formées pourront être utilisées dans des applications très variées dans de nombreux domaines industriels notamment : en médecine humaine et vétérinaire, cosmétique, chimie, agrochimie, alimentaire. La molécule d'intérêt biologique sera alors choisie en fonction de l'application. A titre d'exemple, on peut citer, les protéines, ADN, fragments d'ADN, antibiotiques, hormones, oligoéléments de nature organique ou sous forme d'ions métalliques ...

Les copolymères de DA et de DP désirés sont préparés selon la méthode décrite dans la publication *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 131-142. Les lots présentés au tableau I (lot 114 présentant un DA de 59,9 et de 66, lot 124 présentant un DA de 59,7 et de 71 et lot 154 présentant un DA de 60,1 et de 70,5 sont dissous dans un tampon acétique AcOH(0,2M)/AcONH₄(0,15M) à différentes concentrations supérieures à C*, notamment comprises entre 5 et 7 fois C*.

Le pH du tampon acétique est 4,5. Après agitation vigoureuse, les nanoparticules se forment spontanément dans la solution.

Les nanoparticules sont caractérisées en solution par SLS (diffusion de la lumière statique) et par DLS (diffusion de la lumière dynamique) et après élimination de la solution par microscopie électronique à transmission (MET).

Exemple 1 : Formation de nanoparticules de chitosane de taille comprise entre 450 et 550 nm

Une solution aqueuse d'acide acétique (CH₃COOH) et d'acétate d'ammonium (CH₃COONH₄) est préparée en mélangeant :

11 mL d'acide acétique et 11,6 g d'acétate d'ammonium dans 1 litre d'eau distillée désionisée pendant environ 30 min. Le pH final de la solution obtenue est égal à 4,5.

Une solution de chitosane obtenu par réacétylation, de concentration égale à 7 fois C* est préparée à partir 0,45 g de chitosane de degré de

polymérisation égal à 2600 et de degré d'acétylation égal à 70% introduit dans 100 mL de la solution aqueuse décrite ci-dessus. L'ensemble est placé sous agitation mécanique à 1250 rpm pendant 8 h. Les nanoparticules obtenues ont un diamètre moyen compris entre 450 et 550 nm.

5 **Exemple 2 : Formation de nanoparticules de chitosane de taille comprise entre 50 et 100 nm**

Une solution aqueuse d'acide acétique (CH_3COOH) et d'acétate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) à pH 4,5 est préparée comme dans l'exemple 1.

Une solution de chitosane obtenu par réacétylation, de concentration égale à
10 9 fois C^* est obtenue en partant de 0,58 g de chitosane de degré de polymérisation égal à 2600 et de degré d'acétylation égal à 70% introduit dans 100 mL de la solution aqueuse d'acide acétique et d'acétate d'ammonium décrite dans l'exemple 1. L'ensemble est placé sous agitation mécanique à 1250 rpm pendant 8 h. Cette solution est ensuite diluée en
15 ajoutant 900 mL ($C = 0,9 C^*$) de la solution aqueuse à pH=4,5 à la solution précédente. L'ensemble est agité pendant une heure. On obtient alors des nanoparticules de diamètre moyens compris entre 50 et 100 nm.

La taille, la dispersion et la forme des nanoparticules obtenues aux
exemples 1 et 2 ont été appréciées par microscopie électronique à
20 transmission, et les données obtenues confirment la taille analysée en diffusion statique et dynamique de la lumière.

REVENDEICATIONS

- 1** - Procédé de préparation de nanoparticules de chitine dans lequel des chaînes copolymère de glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liés par une liaison $\beta,(1\rightarrow4)$, qui présentent un degré moyen d'acétylation DA supérieur ou égal à 50 % et un degré de polymérisation moyen en poids DP_w supérieur ou égal à 1500, sont dispersées à une concentration C au moins égale à la concentration C^* d'enchevêtrement des chaînes copolymères, dans une solution aqueuse dont le pH est compris entre 1 et 8, la dite solution étant obtenue par mélange en solution aqueuse d'un acide et d'un sel.
- 2** - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'acide est choisi parmi l'acide chlorhydrique, l'acide perchlorique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide chloroacétique, l'acide citrique, l'acide picrique, l'acide ascorbique et les acides gras comprenant jusqu'à 12 atomes de carbone.
- 3** - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'acide est l'acide acétique.
- 4** - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le sel est un sel de l'acide chlorhydrique, de l'acide perchlorique, de l'acide acétique, de l'acide formique, de l'acide chloroacétique, de l'acide citrique, de l'acide picrique, de l'acide ascorbique ou d'un acide gras comprenant jusqu'à 12 atomes de carbone.
- 5** - Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le sel est l'acétate d'ammonium.
- 6** - Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la solution aqueuse contient de 0,05 à 5 mol/L de sel, de préférence de 0,1 à 0,5 mol/L de sel.
- 7** - Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la solution aqueuse présente un pH compris dans la gamme allant de 2 à 7,5, de préférence dans la gamme allant de 4,5 à 7,5.
- 8** - Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les chaînes de copolymères sont statistiques.

9 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les chaînes de copolymères présentent un indice de polymolécularité **I_p** inférieur à 2, de préférence inférieur à 1,6 et préférentiellement inférieur à 1,3.

10 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la concentration C est comprise dans la gamme allant de 5 fois **C*** à 10 fois **C***.

11 - Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la concentration C est comprise dans la gamme allant de 6 fois **C*** à 7 fois **C***.

12 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la concentration C est inférieure ou égale à 7 fois **C***, l'apparition de nanoparticules se faisant alors spontanément.

13 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'après apparition de nanoparticules, la concentration C en copolymère est abaissée par dilution.

14 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la concentration C est supérieure à 7 fois **C***, et en ce qu'après apparition d'un gel ou de nanoparticules, la concentration C en copolymère est abaissée par dilution.

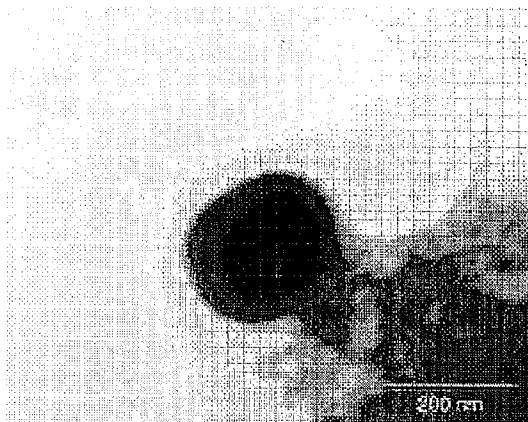
15 - Procédé selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce que la dilution est choisie, de façon à ajuster la taille des nanoparticules.

16 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que les nanoparticules formées présentent un diamètre compris entre 50 nm et 1 µm.

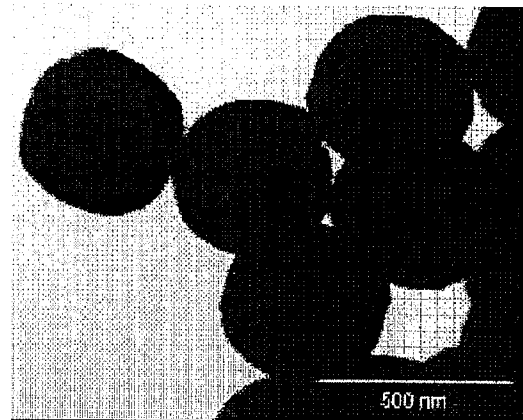
17 - Nanoparticules susceptibles d'être obtenues selon le procédé tel que défini à l'une des revendications 1 à 16.

18 - Vecteurs de molécules d'intérêt biologique comportant des nanoparticules selon la revendication 17 en association avec au moins une molécule d'intérêt biologique.

1/1

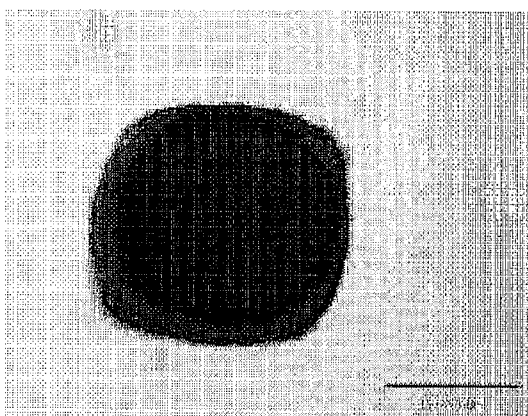


DA = 50 %, DP = 2 600

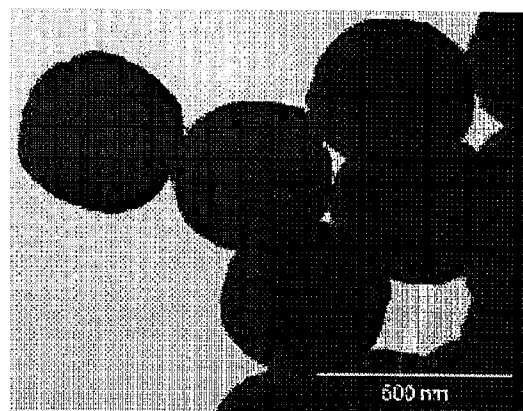


DA = 70 %, DP = 2 600

FIG.1

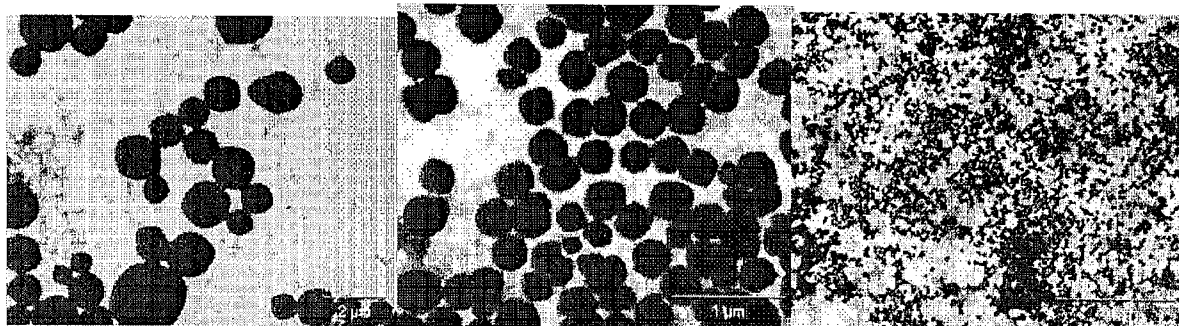


DA = 70 %, DP = 2 200



DA = 70 %, DP = 2 600

FIG.2



Concentration polymère > C*

Concentration polymère < C*, après dissolution de la solution précédente

FIG.3