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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

PCT

(43) Date de la publication internationale
31 décembre 2008 (31.12.2008)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/001019 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 33/00* (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01) *B01J 13/06* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2008/051042

(22) Date de dépôt international : 11 juin 2008 (11.06.2008)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0755652 11 juin 2007 (11.06.2007) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **UNIVERSITE D'ANGERS** [FR/FR]; 40 rue de Rennes, F-49035 Angers Cedex 01 (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **SAULNIER, Patrick** [FR/FR]; 2 rue des Fleurs, F-49330 Marigne (FR). **BENOIT, Jean-Pierre** [FR/FR]; 81 avenue René Gasnier, F-49100 Angers (FR). **ANTON, Nicolas** [FR/FR]; 3, rue de Bourtzwiller, F-67100 Strasbourg (FR).

(74) Mandataire : **LE COUPANEC, Pascale**; Nony & Associes, 3 rue de Penthièvre, F-75008 Paris (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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, 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, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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*

WO 2009/001019 A2

(54) **Title:** NANOCAPSULES WITH LIQUID LIPIDIC CORE LOADED WITH WATER-SOLUBLE OR WATER-DISPERSIBLE INGREDIENT(S)

(54) **Titre :** NANOCAPSULES A COEUR LIPIDIQUE LIQUIDE CHARGEES EN ACTIFS(S) HYDROSOLUBLE(S) OU HYDRODISPERSIBLE(S)

(57) **Abstract:** The invention relates to nanocapsules with a liquid lipidic core and a solid lipidic shell, the lipidic core being loaded with at least one water-soluble or water-dispersible ingredient, said ingredient being present in the form of a reverse micellar system.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne des nanocapsules à cœur lipidique liquide et écorce lipidique solide et chargées au sein de leur cœur lipidique en au moins un actif hydrosoluble ou hydrodispersible, ledit actif y étant présent sous la forme d'un système micellaire inverse.

Nanocapsules à cœur lipidique liquide chargées en actif(s) hydrosoluble(s) ou hydrodispersible(s)

La présente invention vise à proposer des nanocapsules à cœur lipidique liquide chargées en actifs au niveau de ce cœur en au moins un actif hydrosoluble ou hydrodispersible.

Des systèmes nanovésiculaires, de type nanocapsules ou nanogouttelettes dont la taille varie de 50 à 500 nanomètres et formés d'un cœur liquide ou solide, enveloppé d'une membrane externe hydrophobe, sont déjà connus. Les constituants de leur membrane peuvent être synthétiques, par exemple de nature polymérique, protéique ou lipidique à l'image des liposomes. Par exemple, les liposomes qui présentent une structure lamellaire formée d'un empilement de couches lipidiques séparées l'une de l'autre par des compartiments aqueux possèdent toujours un cœur aqueux.

Ces structures nanométriques ont également déjà été proposées à des fins d'encapsulation d'actifs soit dans leur cœur aqueux lorsque l'actif est hydrosoluble ou hydrodispersible, soit dans leur couche lipidique lorsque l'actif est liposoluble ou lipodispersible.

Par exemple, le brevet US 5,961,970 propose à titre de véhicule d'actifs, des émulsions huile-dans-eau à échelle submicronique, c'est-à-dire des mini émulsions dont les gouttelettes possèdent un noyau hydrophobe de nature lipidique et sont stabilisées en surface par des tensioactifs amphiphiles et/ou non ioniques à l'image des tensioactifs de type phospholipides. Ces gouttelettes sont ainsi maintenues en suspension dans une phase aqueuse. Ce type d'émulsion submicronique est obtenu à partir d'une émulsion de base en soumettant celle-ci à plusieurs cycles successifs d'homogénéisation sous fort cisaillement.

Quant au brevet US 5 576 016, il décrit des macroémulsions dont les gouttelettes sont formées d'un noyau lipidique solide et qui sont stabilisées par une enveloppe phospholipidique. Cette enveloppe phospholipidique possède une structure lamellaire formée d'une ou plusieurs couches de molécules phospholipides à l'image des liposomes. Un actif hautement hydrophobe peut être chargé au niveau du noyau et un actif hydrosoluble peut être en revanche incorporé dans les compartiments aqueux présents dans l'enveloppe phospholipidique.

Par ailleurs, les inventeurs ont également décrit dans le brevet EP 1 265 698 à titre de véhicule d'actifs liposolubles ou lipodispersibles, des nanocapsules à cœur liquide

et écorce solide de nature lipidique et une technologie originale permettant d'y accéder. Plus précisément, ces nanocapsules sont obtenues à partir d'une microémulsion, cette microémulsion étant préparée par la technique d'inversion de phase par effet thermique (émulsion PIT).

Le principe d'émulsification par inversion de phase en température (en anglais : Phase Inversion Temperature ou PIT) est bien connu de l'homme de l'art ; il a été décrit en 1968 par K. Shinoda (J. Chem. Soc. Jpn., 1968, 89, 435). Il a été montré que cette technique d'émulsification permet d'obtenir des émulsions fines stables (K. Shinoda et H. Saito, J. Colloïd Interface Sci., 1969, 30, 258).

Le principe de cette technique est le suivant : on prépare une émulsion, par exemple E/H, à une température qui doit être supérieure à la température d'inversion de phase du système, c'est à dire la température à laquelle l'équilibre entre les propriétés hydrophile et lipophile du système tensioactif mis en œuvre est atteint. A température élevée, c'est-à-dire supérieure à la température d'inversion de phase (>PIT), l'émulsion est de type eau-dans-huile, et, au cours de son refroidissement, cette émulsion s'inverse à la température d'inversion de phase, pour devenir une émulsion de type huile-dans-eau, et ceci en étant passée auparavant par un état de microémulsion. Cette technique permet notamment d'accéder à une taille moyenne des globules constituant la phase huileuse variant de 0,1 à 4 μm (100 à 4000 nm).

Toutefois, les nanocapsules ainsi obtenues n'y sont proposées qu'à des fins d'encapsulation, au sein de leur cœur huileux, d'actifs lipophiles ou lipodispersibles. Or, pour des raisons évidentes, il serait avantageux de tirer également profit de ces nanocapsules pour l'encapsulation d'actifs hydrosolubles ou hydrodispersibles.

Au sens de la présente invention, l'actif hydrodispersible est avantageusement un actif non lipophile.

La présente invention vise précisément à proposer une solution permettant de réaliser ce type d'encapsulation.

Plus précisément, la présente invention vise, selon un premier de ses aspects, des nanocapsules à cœur lipidique liquide et écorce lipidique solide et chargées au sein de leur cœur lipidique en au moins un actif hydrosoluble ou hydrodispersible, ledit actif y étant incorporé sous la forme d'un système micellaire inverse.

Selon un autre de ses aspects, la présente invention concerne un procédé utile pour préparer des nanocapsules à cœur lipidique liquide et écorce lipidique solide et chargées au niveau de leur cœur lipidique en au moins un actif hydrosoluble ou hydrodispersible, ledit procédé comprenant au moins les étapes consistant à :

- disposer d'une émulsion huile-dans-eau, contenant au moins un actif hydrosoluble ou hydrodispersible sous la forme d'un système micellaire inverse et au moins un système tensioactif contenant au moins un tensioactif thermosensible, non ionique et hydrophile, et le cas échéant un tensioactif lipophile
- augmenter sa température jusqu'à une température T_2 supérieure à sa température d'inversion de phase (TIP) pour obtenir une émulsion eau-dans-huile suivie d'une diminution de la température jusqu'à une température T_1, $T_1<TIP<T_2$ pour obtenir de nouveau une émulsion huile-dans-eau,
- effectuer un ou plusieurs cycles de température autour de la zone d'inversion de phase entre T_1 et T_2, et
- stabiliser ledit système à une température située dans ou au proche voisinage de l'inversion de phase pour former la microémulsion attendue, et
- effectuer la trempe de ladite microémulsion de manière à obtenir des nanocapsules formées d'un cœur lipidique liquide à température ambiante enrobé d'une écorce lipidique solide à température ambiante et comprenant ledit actif sous la forme d'un système micellaire inverse.

La présente invention résulte plus particulièrement de l'observation par les inventeurs que contre tout attente, une émulsion huile dans eau contenant au moins un actif hydrosoluble ou hydrodispersible sous la forme d'un système micellaire inverse s'avère capable de former, lorsqu'on lui impose au moins une opération d'inversion de phase en température, une microémulsion dont la trempe conduit à la formation de nanocapsules contenant au sein de leur cœur lipidique les micelles d'actifs hydrosolubles ou hydrodispersibles. De manière surprenante, le déroulement de l'ensemble des étapes nécessaires à l'obtention des nanocapsules attendues n'affecte pas la stabilité du système micellaire inverse de l'actif hydrosoluble ou hydrodispersible.

Actif

Au sens de l'invention, l'expression « système micellaire inverse d'actif hydrosoluble ou hydrodispersible » désigne une architecture dans laquelle les actifs hydrosolubles ou hydrodispersibles sont stabilisés dans une phase huileuse par l'intermédiaire des molécules du tensioactif ou du système tensioactif formant le système micellaire contenant l'actif.

Au sens de la présente invention, l'actif hydrodispersible est avantageusement un actif non lipophile.

Les systèmes micelles inverses sont bien connus de l'homme de l'art et notamment exploités pour réaliser des extractions sélectives de protéines ou enzymes d'intérêt.

Pour des raisons évidentes, le choix du système tensioactif mis en œuvre pour former le système micellaire inverse est à effectuer en tenant compte de la solubilité du ou des tensioactifs le formant, dans la phase huileuse de l'émulsion huile-dans-eau dans laquelle l'actif est précisément destiné à être formulé. Cette sélection relève clairement des compétences de l'homme de l'art.

Avantageusement, les tensioactifs utilisés pour élaborer ces micelles inverses et convenant à l'invention possèdent une valeur HLB inférieure à 10, en particulier inférieure ou égale à 6. Ils peuvent indifféremment appartenir aux familles des tensioactifs ioniques, non ioniques ou amphotères.

Ces tensioactifs peuvent être mis en œuvre dans un rapport pondéral actif(s)/tensioactif(s) variant de 0,01 à 0,3 et en particulier de 0,05 à 0,1.

Avantageusement, ces tensioactifs peuvent être associés à des co-tensioactifs comme par exemple des phospholipides. A ce titre, les phosphatidylcholines (lécithine) sont particulièrement intéressants.

D'autres phospholipides convenant à l'invention, peuvent être le phosphatidylglycérol, le phosphatidylinositol, la phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique et la phosphatidyléthanolamine.

Le système micellaire inverse contenant l'actif hydrosoluble ou hydrodispersible à encapsuler est préparé antérieurement à sa mise en présence avec l'émulsion de manière à stabiliser les micelles inverses dans l'huile.

Cette suspension micellaire huileuse est ensuite, soit incorporée en début de formulation avant le ou les cyclages thermiques ou alors, rajoutée une fois que le système est sous sa forme de microémulsion, c'est-à-dire dans la zone d'inversion de phase du système émulsionné.

Par exemple, ils peuvent être préparés comme suit :

Un actif hydrophile, comme par exemple des cristaux de fluorescéine de sodium, est incorporé sous chauffage à 50 °C et sous agitation dans une phase huileuse par exemple du Labrafac contenant des micelles inverses d'un tensioactif tel que le Span 80® (10 % masse/masse).

A titre illustratif et non limitatif des actifs hydrosolubles ou hydrodispersibles pouvant être encapsulés selon l'invention, on peut notamment citer le 5-Fluoro-uracile, la gemcitabine, la doxorubicine et les héparines de bas poids moléculaire.

Outre cet actif hydrosoluble ou hydrodispersible encapsulé dans leur cœur lipidique, les nanocapsules peuvent bien entendu contenir d'autres actifs hydrosolubles adsorbés au niveau de leur écorce ou d'autres actifs liposolubles encapsulés dans leur cœur lipidique.

Au sens de l'invention, le terme « adsorbé » signifie que l'actif est incorporé au sein de l'écorce. Ce phénomène d'adsorption est à distinguer d'une simple liaison covalente établie entre une fonction présente sur ledit actif et une fonction présente en surface de l'écorce des nanocapsules.

L'actif peut notamment être un composé pharmaceutiquement actif, cosmétiquement actif ou encore actif dans un domaine phytosanitaire ou alimentaire.

Selon un mode réalisation préféré, cet actif est un principe pharmaceutiquement actif.

D'une manière générale, les nanocapsules de l'invention conviennent plus particulièrement pour l'administration des principes actifs suivants : les anti-infectieux parmi lesquels les antimycosiques, les antibiotiques, les anticancéreux, les immunosuppresseurs, les principes actifs destinés au Système Nerveux Central qui doivent passer la barrière hémato-encéphalique, tels que les antiparkinsoniens, les antalgiques et plus généralement les principes actifs pour traiter les maladies neurodégénératives.

Un tel actif peut être également de nature protéique, peptidique. Il peut aussi s'agir d'acides nucléiques tels qu'un plasmide d'ADN ou un ARN d'interférence.

L'actif peut être aussi un radiopharmaceutique. Il peut également s'agir d'un gaz ou d'un fluide pouvant se transformer en gaz.

Emulsion et Microémulsion

Tout d'abord, il importe de noter qu'une microémulsion est différente d'une mini-émulsion et d'une macroémulsion notamment telles qu'illustrées dans les brevets US 5 961 971 et US 5 576 016. En effet, une microémulsion correspond à une structuration bicontinue de la matière sous forme de structures micellaires gonflées d'huile ou d'eau. Ces structures micellaires sont fortement imbriquées les unes par rapport aux autres et constituent ainsi un réseau tridimensionnel homogène cohésif et stabilisé. On ne peut ainsi y distinguer une phase dispersée d'une phase continue. Cette microémulsion est en équilibre thermodynamique et donc, ne peut exister que dans des conditions très précises de température, pression et composition.

L'émulsion de départ destinée à former la microémulsion peut comprendre au moins une phase grasse huileuse, une phase aqueuse et un système tensioactif comprenant au moins un tensioactif thermosensible, hydrophile et non ionique, et le cas échéant, selon un mode de réalisation préféré, un tensioactif lipophile.

a-Phase grasse huileuse

La phase grasse huileuse est formée d'au moins un corps gras liquide ou semi-liquide à température ambiante, et en particulier d'au moins un triglycéride, d'un ester d'acide gras, ou d'un de leurs mélanges.

L'ester d'acide gras peut être plus particulièrement choisi parmi les esters d'acides gras en C_8 à C_{18}, notamment en C_8 à C_{12} et notamment le palmitate d'éthyle, l'oléate d'éthyle, le myristate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, le myristate d'octydodécyle et leurs mélanges.

Les triglycérides mis en œuvre peuvent être des triglycérides de synthèse ou des triglycérides d'origine naturelle. Les sources naturelles peuvent inclure les graisses animales ou les huiles végétales par exemple les huiles de soja ou les sources en triglycérides à longue chaîne (LCT).

D'autres triglycérides d'intérêt sont composés principalement d'acides gras de longueurs moyennes encore appelés triglycérides à chaîne moyenne (MCT). Une huile à

triglycérides à chaîne moyenne (MCT) est un triglycéride dans lequel la chaîne carbohydrate à de 8 à 12 atomes de carbone.

De telles huiles MCT sont disponibles commercialement.

A titre d'exemple de ces huiles MCT, on peut citer les TCR (nom commercial de la société industrielle des oléagineux, France, pour un mélange de triglycérides dans lequel environ 95 % des chaînes d'acides gras possèdent 8 ou 10 atomes de carbone) et le Myglyol® 812 (triglycéride commercialisé par la société Dynamit Nobel, Suède pour un mélange de triesters de glycérides d'acide caprylique et caprique).

Les motifs d'acides gras de ces triglycérides peuvent être insaturés, monoinsaturés ou polyinsaturés. Les mélanges de triglycérides ayant des motifs d'acides gras variables sont également acceptables.

Il est à noter que plus l'indice HLB du corps gras liquide ou semi-liquide est élevé, plus la température d'inversion de phase est élevée. En revanche, la valeur de l'indice HLB du corps gras ne semble pas avoir d'influence sur la taille des nanocapsules.

Ainsi, lorsque la taille des groupements terminaux des triglycérides augmente, leur indice HLB diminue et la température d'inversion de phase diminue.

L'indice HLB ou balance hydrophile-lipophile est tel que défini par C. Larpent dans le Traité K.342 des Editions TECHNIQUES DE L'INGENIEUR.

Convient tout particulièrement à l'invention, le triglycéride commercialisé sous le nom Labrafac WL 1349®.

b-Système tensio-actif

Ce système tensioactif comprend au moins un tensioactif thermosensible, hydrophile et non ionique, pouvant être associé à un tensioactif lipophile.

Selon un mode de réalisation préféré, le système tensioactif mis en œuvre dans le procédé revendiqué n'est formé que de tensioactif(s) thermosensible(s) hydrophile(s) et non ionique(s).

Le tensioactif hydrophile est plus particulièrement choisi parmi les tensioactifs émulsionnants du type huile-dans-eau habituellement utilisés qui ont un HLB (HLB = Hydrophilic Lipophilic Balance) allant de 8 à 18. Ces émulsionnants, grâce à leur structure amphiphile, se placent à l'interface phase huileuse / phase aqueuse, et stabilisent ainsi les gouttelettes d'huiles dispersées.

Le système tensioactif utilisé dans la microémulsion peut comprendre un ou plusieurs tensioactifs dont la solubilité dans l'huile augmente avec l'augmentation de la température. Le HLB de ces tensioactifs peut varier de 8 à 18, et de préférence de 10 à 16, et ces tensioactifs peuvent être choisis parmi les alcools gras éthoxylés, les acides gras éthoxylés, les glycérides partiels d'acides gras éthoxylés, les triglycérides d'acides gras polyéthoxylés, et leurs mélanges.

Comme alcools gras éthoxylés, on peut citer par exemple les produits d'addition d'oxyde d'éthylène avec l'alcool laurylique, notamment ceux comportant de 9 à 50 groupes oxyéthylénés (Laureth-9 à Laureth-50 en noms CTFA) ; les produits d'addition d'oxyde d'éthylène avec l'alcool béhénylique, notamment ceux comportant de 9 à 50 groupes oxyéthylénés (Beheneth-9 à Beheneth-50 en noms CTFA) ; les produits d'addition d'oxyde d'éthylène avec l'alcool céto-stéarylique (mélange d'alcool cétylique et d'alcool stéarylique), notamment ceux comportant de 9 à 30 groupes oxyéthylénés (Ceteareth-9 à Ceteareth-30 en noms CTFA) ; les produits d'addition d'oxyde d'éthylène avec l'alcool cétylique, notamment ceux comportant de 9 à 30 groupes oxyéthylénés (Ceteth-9 à Ceteth-30 en noms CTFA) ; les produits d'addition d'oxyde d'éthylène avec l'alcool stéarylique, notamment ceux comportant de 9 à 30 groupes oxyéthylénés (Steareth-9 à Steareth-30 en noms CTFA) ; les produits d'addition d'oxyde d'éthylène avec l'alcool isostéarylique, notamment ceux comportant de 9 à 50 groupes oxyéthylénés (Isosteareth-9 à Isosteareth-50 en noms CTFA) ; et leurs mélanges.

Comme acides gras éthoxylés, on peut citer par exemple les produits d'addition d'oxyde d'éthylène avec les acides laurique, palmitique, stéarique ou béhénique, et leurs mélanges, notamment ceux comportant de 9 à 50 groupes oxyéthylénés tels que les laurates de PEG-9 à PEG-50 (en noms CTFA : PEG-9 laurate à PEG-50 laurate) ; les palmitates de PEG-9 à PEG-50 (en noms CTFA : PEG-9 palmitate à PEG-50 palmitate) ; les stéarates de PEG-9 à PEG-50 (en noms CTFA : PEG-9 stéarate à PEG-50 stéarate) ; les palmito-stéarates de PEG-9 à PEG-50 ; les béhénates de PEG-9 à PEG-50 (en noms CTFA : PEG-9 béhénate à PEG-50 béhénate) ; et leurs mélanges.

On peut utiliser aussi des mélanges de ces dérivés oxyéthylénés d'alcools gras et d'acides gras.

Ces tensioactifs peuvent également être soit des composés naturels à l'image des phospholipides écholates ou des composés synthétiques tels que les polysorbates qui

sont des esters d'acide gras de sorbitol polyéthoxylé (Tween®), les esters de polyéthylène glycol d'acide gras provenant par exemple de l'huile de ricin (Crémophor®), des acides gras polyéthoxylés, par exemple de l'acide stéarique (Simulsol M-53®), des éthers d'alcool gras polyoxyéthylénés (Brij®), des éthers non phényles polyoxyéthylénés (Triton N®), des éthers hydroxylphényle polyoxyéthylénés (Triton X®).

Il peut plus particulièrement s'agir d'un 2-hydroxystéarate polyéthylène glycol et notamment celui commercialisé sous le nom Solutol® HS15 par la société BASF (Allemagne).

Comme précisé précédemment, le système tensioactif retenu selon l'invention comprend avantageusement outre le tensioactif thermosensible, hydrophile et non ionique, au moins un tensioactif lipophile.

Le tensioactif lipophile est plus particulièrement à base de phospholipides qui sont avantageux au regard de leur caractère biocompatible.

Parmi les phospholipides, les phosphatidylcholines (lécithine) sont particulièrement intéressants.

D'autres phospholipides peuvent être le phosphatidylglycérol, le phosphatidylinositol, la phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique et la phosphatidyléthanolamine.

Les dérivés phospholipides peuvent être isolés à partir de sources naturelles ou préparés par synthèse.

A titre de produits commerciaux dérivant des phospholipides, on peut plus particulièrement citer :

- l'EPICURON 120® (Lukas Meyer, Allemagne) qui est un mélange d'environ 70 % de phosphatidylcholine, 12 % de phosphatidyléthanolamine, et environ 15 % d'autres phospholipides ;

- l'OVOTINE 160® (Lukas Meyer, Allemagne) qui est un mélange comprenant environ 60 % de phosphatidylcholine, 18 % de phosphatidyléthanolamine, et 12 % d'autres phospholipides,

- un mélange de phospholipides purifiés à l'image des produits Lipoïd E75 ou Lipoïds E-80 (Lipoïd®, Allemagne) qui est un mélange de phospholipides comprenant environ 80 % en poids de phosphatidylcholine, 8 % en poids de phosphatidyléthanolamine, 3,6 % en poids de lipides non polaires et 2 % de sphingomyéline.

Selon un mode de réalisation préféré, le tensioactif lipophile est une lécithine dont la proportion en phosphatidylcholine varie de 40 à 80 % en poids.

Convient tout particulièrement comme source de phosphatidylcholine, le Lipoïd S75-3 (Lipoïd® GmbH, Allemagne). Il s'agit de lécithine de soja. Cette dernière contient environ 69 % de phosphatidylcholine et 9 % de phosphatidyléthanolamine. Ce constituant est le seul constituant solide à 37° et à température ambiante dans la formulation.

On peut également utiliser le polyglycéryl-6-dioléate (Plurol®).

Le rapport corps gras liquide/tensio-actif(s) lipidique(s) peut varier de 1 à 15, de préférence de 1,5 à 13, plus préférentiellement de 3 à 8.

Il est à noter que la taille des particules diminue quand la proportion en agent tensio-actif hydrophile augmente et quand la proportion en agents tensioactifs (hydrophile et le cas échéant lipophile) augmente. En effet, l'agent tensio-actif entraîne une diminution de la tension interfaciale et donc une stabilisation du système ce qui favorise l'obtention de petites particules.

Par ailleurs, la taille des particules augmente quand la proportion d'huile augmente.

Pour sa part, la phase aqueuse de la microémulsion peut également avantageusement contenir 1 à 4 % d'un sel notamment inorganique, comme par exemple le chlorure de sodium. En effet, la modification de la concentration en sel entraîne un déplacement de la zone d'inversion de phase. Ainsi, plus la concentration en sel augmente et plus la température d'inversion de phase est basse. Ce phénomène s'avère tout particulièrement intéressant pour l'encapsulation de principes actifs thermosensibles hydrophobes.

Selon un mode de réalisation particulier, la microémulsion contient avantageusement de 1 à 3 % de tensio-actif(s) lipophile(s), de 5 à 15 % de tensio-actif(s) hydrophile(s), de 5 à 15 % d'une phase huileuse, de 64 à 89 % d'une phase aqueuse (les pourcentages sont exprimés en poids par rapport au poids total de la microémulsion).

Selon un mode de réalisation, une microémulsion de l'invention peut être formée d'au moins un triglycéride d'acide gras et d'un dérivé 2-hydroxystérate de polyéthylène glycol, et le cas échéant d'une lécithine.

Dans un mode de réalisation préféré, la phase grasse est un triglycéride d'acide gras, le tensio-actif lipophile est une lécithine et le tensio-actif hydrophile est un dérivé de 2-hydroxystéarate polyéthylène glycol et notamment le Solutol® HS15.

Comme précisé précédemment, l'émulsion considérée selon l'invention est transformée en une microémulsion selon la technique d'inversion de phase, en particulier par changement de température.

Cette inversion de phase en température est avantageusement provoquée par en imposant au moins un cycle de montée et de descente en température à l'émulsion.

La répétition de cycles de température est avantageuse à plusieurs titres. Ainsi, il a été constaté qu'au cours des cycles de température, l'écorce des nanoparticules qui se forment après trempage gagne avantageusement en épaisseur et donc en stabilité.

De plus, il est à noter que la température de la zone d'inversion de phase a tendance à décroître au fur et à mesure des cycles de températures imposés. Ce phénomène est précisément avantageux lorsque l'actif que l'on souhaite encapsuler ou adsorber est un actif sensible à la température. Dans de telles conditions, on privilégie l'introduction de l'actif au moment d'un cycle compatible en température.

Plus précisément, il est imposé à l'émulsion considérée selon l'invention et avant la trempe destinée à former les nanocapsules chargées en au moins un actif hydrophile, au moins les étapes consistant à

- augmenter sa température jusqu'à une température T_2 supérieure à sa température d'inversion de phase (TIP) pour obtenir une émulsion eau-dans-huile suivie d'une diminution de la température jusqu'à une température T_1, $T_1<TIP<T_2$ pour obtenir de nouveau une émulsion huile-dans-eau,
- le cas échéant, effectuer un ou plusieurs cycles de température autour de la zone d'inversion de phase entre T_1 et T_2 et
- stabiliser ledit système à une température située dans ou au proche voisinage de l'inversion de phase pour former la microémulsion attendue.

Ainsi, on peut avantageusement effectuer un ou plusieurs cycles de température autour de la zone d'inversion de phase entre T_1 et T_2, jusqu'à observer une suspension translucide, qui correspond à la formation d'une microémulsion. On stabilise alors le système à une température qui correspond à la structuration du système en la microémulsion attendue.

Plus précisément, l'inversion de phase entre l'émulsion huile/eau et l'émulsion eau/huile se traduit par une diminution de la conductivité quand la température augmente jusqu'à ce qu'elle s'annule.

Ainsi, T_1 est une température à laquelle la conductivité est au moins égale à 90 - 95 % de la conductivité mesurée à 20 °C et T_2 est la température à laquelle la conductivité s'annule et l'émulsion eau dans huile se forme. La température moyenne de la zone d'inversion de phase correspond à la température d'inversion de phase (TIP).

Dans la zone de formation d'une microémulsion (mélange translucide), les interactions hydrophiles et hydrophobes sont équilibrées car la tendance du système tensioactif est de former aussi bien des micelles directes que des micelles inverses. Par chauffage au-delà de cette zone, il y a formation d'une émulsion E/H (mélange opaque blanc), car le tensioactif favorise la formation d'une émulsion eau dans huile. Puis lors du refroidissement en dessous de la zone d'inversion de phase, l'émulsion devient une émulsion H/E.

Le nombre de cycles appliqués à la microémulsion dépend de la quantité d'énergie nécessaire pour former les nanocapsules.

Cette technologie est plus particulièrement décrite dans le brevet EP 1 265 698 dont le contenu est intégré à la présente demande.

Ainsi, l'ensemble des constituants destinés à former la microémulsion est pesé dans un récipient. Le mélange est homogénéisé, par exemple au moyen d'un Rayneri 350 tours/min, et chauffé en augmentant progressivement la température au moyen d'un bain marie jusqu'à une température supérieure ou égale à la température d'inversion de phase T2, c'est-à-dire jusqu'à l'obtention d'une phase transparente ou translucide (zone de microémulsion ou de phase lamellaire) puis d'une phase blanche plus visqueuse qui indique l'obtention de l'émulsion inverse (E/H). Le chauffage est alors stoppé et l'agitation maintenue jusqu'à retour à la température ambiante, en passant par la température d'inversion de phase T1, c'est-à-dire la température à laquelle se forme la microémulsion attendue. Lorsque la température est redescendue en dessous de la zone d'inversion de Phase en Température (T1), on obtient cette microémulsion stable.

La microémulsion ayant formée subit consécutivement une trempe selon l'invention.

Cette étape destinée à former les nanocapsules selon l'invention consiste en un refroidissement brusque (ou trempe) de la microémulsion à une température propice à la solidification des films interfaciaux composant la microémulsion, avantageusement à une température très inférieure à T1 sous agitation magnétique.

Par exemple, on peut effectuer la trempe de ladite microémulsion chargée en au moins ledit actif à une température au moins 30 °C inférieure à la TIP au moment du trempage.

Cette trempe peut être effectuée en diluant le milieu de 3 à 10 fois à l'aide d'eau désionisée à 2 °C +/- 1 °C jetée dans la microémulsion fine. Les nanocapsules obtenues sont maintenues sous agitation pendant 5 min.

L'organisation du système sous forme de nanocapsules après trempage se traduit visuellement par un changement d'aspect du système initial qui passe de blanc-opaque à blanc-translucide avec effet Tyndall (reflets bleutés). Ce changement se produit à une température inférieure à la TIP. Cette température est située généralement entre 6 à 15 °C en dessous de la TIP.

A l'issue du procédé selon l'invention, des nanocapsules chargés au niveau de leur cœur lipidique en au moins un actif hydrosoluble sont obtenues.

Au sens de l'invention le terme nanocapsules est à distinguer de nanosphères. On entend par nanocapsules des particules constituées d'un coeur liquide ou semi-liquide à température ambiante, enrobé d'un film solide à température ambiante, par opposition à des nanosphères qui sont des particules matricielles, i.e. dont la totalité de la masse est solide. Ainsi, lorsque les nanosphères contiennent un principe pharmaceutiquement actif, celui-ci est finement dispersé dans la matrice solide.

Avantageusement, les nanocapsules obtenues selon l'invention possèdent une taille moyenne inférieure à 150 nm, de préférence inférieure à 100 nm, de préférence encore inférieure à 50 nm. Ces tailles peuvent être déterminées par spectroscopie à corrélation de photons, microscopie électronique à balayage, microscopie électronique à transmission en mode cryoscopique.

L'épaisseur du film ou écorce solide est avantageusement comprise entre 2 à 10 nm. Elle est égale environ au dixième du diamètre des particules. Cette épaisseur peut être calculée par bilan de masse, ou visualisée par microscopie électronique à transmission par

ombrage négatif ou alors par microscopie électronique à transmission en mode cryoscopique.

Compte-tenu de leur taille, les nanocapsules de l'invention sont des particules lipidiques colloïdales.

L'indice de polydispersité des nanocapsules de l'invention est avantageusement compris entre 5 et 15 %. Cet indice est déterminé sur l'histogramme de taille obtenu par méthode de spectroscopie à corrélation de photons.

Les nanocapsules sont chacunes constituées d'un coeur essentiellement lipidique liquide ou semi-liquide à température ambiante, enrobé d'une écorce essentiellement lipidique solide à température ambiante.

Au sens de l'invention, l'expression « essentiellement lipidique » signifie que le noyau et l'écorce formant les nanocapsules selon l'invention sont constituées à plus de 50 % en poids, en particulier à plus de 75 % en poids, notamment à plus de 80 % en poids, voire plus de 90 %, plus particulièrement plus de 95 % de leurs poids respectifs, voire en totalité d'un ou plusieurs composés lipidiques (hydrophobes).

Selon un mode de réalisation, une nanocapsule selon l'invention peut comprendre une écorce formée d'au moins un tensioactif lipophile solide à température ambiante.

Les nanocapsules conformes à l'invention sont particulièrement avantageuses à titre de véhicule de formulation d'actifs. Par exemple, ces nanocapsules peuvent être utiles pour la fabrication de compositions phytosanitaires ou pharmaceutiques.

La présente invention vise également des compositions contenant des nanocapsules conformes à l'invention.

Au sens de l'invention, l'expression température ambiante désigne une température variant de 18 à 25 °C.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants qui sont présentés à titre illustratif et non limitatif du domaine de l'invention.

Exemple 1 : Préparation de nanocapsules dont le cœur lipidique est chargée en un actif hydrosoluble

On réalise 5 g d'une émulsion contenant 75 mg de Lipoïd S75-3®, 504 mg de Labrafac WL 1349® lipophile, 504 mg de Solutol HS® 15,383 g d'eau et 88 mg de chlorure de sodium.

Parallèlement, des cristaux de fluorescéine de sodium (10 mg) sont incorporés sous chauffage à 50 °C et sous agitation dans le Labrafac (3g) contenant des micelles inverses de Span 80 (0,6 g) (20 % masse/masse).

Après homogénéisation de cette suspension micellaire, 0,25 ml en sont introduits dans l'émulsion précédente.

L'ensemble est placé sous agitation magnétique. Un chauffage est appliqué jusqu'à atteindre une température de 85 °C. Toujours sous agitation magnétique, on laisse refroidir le système jusqu'à une température de 60 °C. Ces cycles thermiques (entre 85 °C et 60 °C) sont réalisés trois fois de façon à obtenir des microémulsions de mieux en mieux structurées. Le système est alors maintenu sous sa forme microémulsion en le stabilisant à une température comprise dans (ou au proche voisinage) de la Zone d'Inversion de Phase, en l'espèce 65 °C.

Les nanocapsules sont finalisées par trempage dans de l'eau froide (5 °C). Les nanocapsules sont séparées du milieu par centrifugation.

REVENDICATIONS

1. Nanocapsules à cœur lipidique liquide et écorce lipidique solide et chargées au sein de leur cœur lipidique en au moins un actif hydrosoluble ou hydrodispersible, ledit actif y étant présent sous la forme d'un système micellaire inverse.

2. Nanocapsules selon la revendication précédente, dans lesquelles le système micellaire inverse comprend un système tensioactif formé d'au moins un tensioactif possédant un HLB inférieur à 10.

3. Nanocapsules selon la revendication précédente, dans lesquelles le système tensioactif est mis en œuvre dans un rapport pondéral actif(s)/tensioactif(s) variant de 0,01 à 0,3 et en particulier de 0,05 à 0,1.

4. Nanocapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, dont le cœur est formé d'au moins un corps gras liquide ou semi-liquide.

5. Nanocapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, dont le coeur comprend au moins un triglycéride, un ester d'acide gras, ou un de leurs mélanges.

6. Nanocapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, dont l'écorce est formée d'au moins un tensioactif lipophile solide à température ambiante.

7. Nanocapsules selon la revendication précédente, dans lesquelles le tensioactif lipophile est à base de phospholipide, et notamment est une lécithine dont la proportion en phosphatidylcholine est comprise entre 40 et 80 % en poids.

8. Nanocapsules selon la revendication 6 ou 7, dans lesquelles le rapport corps gras liquide/tensioactif lipophile varie de 1 à 15, notamment de 1,5 à 13 et plus particulièrement de 3 à 8.

9. Nanocapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, possédant une taille moyenne inférieure à 150 nm, notamment inférieure à 100 nm et plus particulièrement inférieure à 50 nm.

10. Nanocapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, possédant une épaisseur d'écorce solide variant de 2 à 10 nm.

11. Nanocapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lesquelles l'actif est un composé pharmaceutiquement actif, cosmétiquement actif ou actif dans un domaine phytosanitaire ou alimentaire.

12. Procédé utile pour la préparation de nanocapsules à cœur lipidique liquide et écorce lipidique solide et chargées au niveau de leur cœur lipidique en au moins un actif hydrosoluble ou hydrodispersible, ledit procédé comprenant au moins les étapes consistant à :

- disposer d'une émulsion huile-dans-eau, contenant au moins un actif hydrosoluble ou hydrodispersible sous la forme d'un système micellaire inverse et au moins un système tensioactif contenant au moins un tensioactif thermosensible, non ionique et hydrophile,
- augmenter sa température jusqu'à une température T_2 supérieure à sa température d'inversion de phase (TIP) pour obtenir une émulsion eau-dans-huile suivie d'une diminution de la température jusqu'à une température T_1, $T_1<TIP<T_2$ pour obtenir de nouveau une émulsion huile-dans-eau,
- le cas échéant, effectuer un ou plusieurs cycles de température autour de la zone d'inversion de phase entre T_1 et T_2,
- stabiliser ledit système à une température située dans ou au proche voisinage de l'inversion de phase pour former la microémulsion attendue, et
- effectuer la trempe de ladite microémulsion, de manière à obtenir des nanocapsules formées d'un cœur lipidique liquide à température ambiante enrobé d'une écorce lipidique solide à température ambiante, et contenant ledit actif sous la forme d'un système micellaire inverse.

13. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel le tensioactif hydrophile possède un HLB allant de 8 à 18, notamment de 10 à 16.

14. Procédé selon la revendication 12 ou 13, dans lequel le tensioactif hydrophile est choisi parmi les alcools gras éthoxylés, les acides gras éthoxylés, les glycérides partiels d'acides gras éthoxylés, les triglycérides d'acides gras polyéthoxylés, et leurs mélanges.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, dans lequel la phase grasse huileuse comprend au moins un composé gras liquide tel que défini en revendication 5.

16. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel le système tensioactif comprend en outre au moins un tensioactif lipophile.

17. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel le tensioactif lipophile est tel que défini en revendications 6 à 8.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le système micellaire inverse est tel que défini en revendications 2 ou 3.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 18, dans lequel la microémulsion est formée d'au moins un triglycéride d'acide gras et d'un dérivé 2-hydroxystérate de polyéthylène glycol, et le cas échéant d'une lécithine.

20. Composition contenant au moins des nanocapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.