

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle

Bureau international



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

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/067037 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
B01J 13/04 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/052500
- (22) Date de dépôt international :
11 décembre 2009 (11.12.2009)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0858547 12 décembre 2008 (12.12.2008) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE D'ANGERS [FR/FR]; 40 rue de Rennes,
F-49000 Angers (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **BENOIT, Jean-Pierre** [FR/FR]; 81 avenue René GASNIER, F-49100 Angers (FR). **THOMAS, Olivier** [FR/FR]; 42 boulevard DAVIERS, F-49100 Angers (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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : METHOD FOR PREPARING LIPID NANOPARTICLES

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION DE NANOPARTICULES LIPIDIQUES

(57) Abstract : The present invention relates to a useful method for preparing nanocapsules with a liquid lipid core and a hard shell and loaded with at least one hydrophilic active agent, said method including at least the steps of: i) using at least one first water-in-oil microemulsion containing, in the hydrophilic phase thereof, at least one hydrophilic active agent; ii) using at least one second microemulsion that is formulated by the phase inversion of an emulsion; iii) adding said first microemulsion into said second microemulsion under conditions that are conducive to the formation of a novel microemulsion architecture wherein said hydrophilic active agent remains present in the hydrophilic phase of the first microemulsion; and iv) quenching the mixture that is formed in the preceding step so as to obtain microcapsules containing said hydrophilic active agent and being made of a lipid core that is liquid at room temperature and coated in a hard film at room temperature. The invention also relates to nanocapsules obtainable by said method.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé utile pour la préparation de nanocapsules à cœur lipidique liquide, écorce solide et chargées en au moins un actif à caractère hydrophile, ledit procédé comprenant au moins les étapes consistant à : i) disposer d'au moins une première microémulsion à caractère eau-dans-huile contenant au niveau de sa phase hydrophile au moins un actif à caractère hydrophile, ii) disposer d'au moins une seconde microémulsion, formulée par inversion de phase d'une émulsion, iii) ajouter ladite première microémulsion dans ladite seconde microémulsion, dans des conditions propices à la formation d'une nouvelle architecture microémulsion dans laquelle ledit actif hydrophile demeure présent au niveau de la phase hydrophile de la première microémulsion, et iv) effectuer la trempe du mélange formé à l'étape précédente, de manière à obtenir des nanocapsules comprenant ledit actif hydrophile et étant formées d'un cœur lipidique, liquide à température ambiante et enrobé d'un film solide à température ambiante. L'invention vise en outre des nanocapsules susceptibles d'être obtenues par ce procédé.

WO 2010/067037 A1

Procédé de préparation de nanoparticules lipidiques

La présente invention vise à proposer un procédé utile pour préparer des nanocapsules lipidiques chargées en au moins un actif et vise en outre de telles
5 nanocapsules et les compositions en contenant.

Des systèmes nanovésiculaires, de type nanocapsules ou nanogouttelettes dont la taille varie de 50 à 500 nanomètres et formés d'un cœur liquide ou semi-solide, enveloppé d'une membrane externe, sont déjà connus. Les constituants de leur membrane peuvent être synthétiques, par exemple de nature polymérique, protéique ou lipidique à
10 l'image des liposomes. Notamment, 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
15 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 miniémulsions dont les gouttelettes possèdent un noyau hydrophobe de nature lipidique et sont stabilisées en
20 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
25 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
30 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 chargées en actifs liposolubles ou lipodispersibles sont obtenues à partir d'une microémulsion, cette microémulsion étant préparée par la technique d'inversion de phase par effet thermique (émulsion PIT).

5 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. Colloid Interface Sci.* », 1969, 30, 258).

10 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, lorsque ces nanocapsules sont destinées à encapsuler un actif, ce procédé impose de disposer dès sa première étape de la matière active que l'on souhaite encapsuler et donc d'effectuer l'intégralité du procédé en présence de cet actif. Or, cette obligation peut être parfois contraignante pour l'homme de l'art.

Par ailleurs, les nanocapsules 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.

20 Ainsi, l'homme de l'art ne dispose pas d'une méthode simple de mise en œuvre et rapide pour accéder à des nanocapsules chargées en actifs, notamment en actifs à caractère hydrophile et, qui plus est, avec un rendement d'encapsulation intéressant.

La présente invention vise précisément à proposer un nouveau procédé permettant de répondre à ce besoin.

25 Plus précisément, la présente invention vise, selon un premier de ses aspects, un procédé utile pour la préparation de nanocapsules à cœur lipidique liquide, écorce solide et chargées en au moins un actif à caractère hydrophile, ledit procédé comprenant au moins les étapes consistant à :

30 i) disposer d'au moins une première microémulsion à caractère eau-dans-huile, stabilisée par au moins un tensioactif lipophile et contenant au niveau de sa phase hydrophile au moins un actif à caractère hydrophile,

ii) disposer d'au moins une seconde microémulsion, distincte de la première microémulsion, formulée par inversion de phase d'une émulsion et stabilisée par au moins un tensioactif thermosensible, non ionique et hydrophile,

iii) ajouter ladite première microémulsion dans ladite seconde microémulsion, dans
5 des conditions propices à la formation d'une nouvelle architecture microémulsion dans laquelle ledit actif hydrophile demeure présent au niveau de la phase hydrophile de la première microémulsion, et

iv) effectuer la trempe du mélange formé à l'étape précédente, de manière à obtenir des nanocapsules comprenant ledit actif hydrophile et étant formées d'un cœur lipidique,
10 liquide à température ambiante et enrobé d'un film solide à température ambiante.

Selon un mode de réalisation particulier, l'actif hydrophile formulé selon le procédé selon l'invention, est à l'issue dudit procédé présent dans le cœur lipidique liquide desdites nanocapsules.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne le procédé
15 précité dans lequel la seconde microémulsion, avant mélange, est une microémulsion eau-dans-huile.

Au sens de la présente invention, le caractère hydrophile signifie que l'actif possède une affinité prépondérante pour l'eau ou un milieu aqueux.

Un composé hydrophile peut donc être en particulier un composé
20 hydrosoluble, voire un composé hydrodispersible.

Au sens de la présente invention, on entend par phase hydrophile, voire polaire, un milieu totalement ou partiellement formé d'eau. Ainsi, il peut être formé en tout ou partie d'eau, en tout ou partie d'au moins un solvant polaire, ou d'un mélange eau/solvant polaire.

25 Selon un autre de ses aspects, la présente invention concerne des nanocapsules susceptibles d'être obtenues par ledit procédé selon la présente invention.

Elle vise également des nanocapsules à cœur lipidique liquide et écorce solide et chargées au sein de leur cœur lipidique liquide en au moins un actif à caractère hydrophile, en particulier hydrosoluble, ledit actif étant présent dans le cœur lipidique
30 liquide sous la forme de microdomaines hydrophiles ou d'une microémulsion à caractère eau-dans-huile comprenant une phase huileuse stabilisée par au moins un tensioactif lipophile et une phase hydrophile incorporant ledit actif.

Elle vise en outre des compositions contenant de telles nanocapsules.

La présente invention résulte plus particulièrement de l'observation par les inventeurs que contre toute attente, une microémulsion obtenue par inversion de phase d'une émulsion, en particulier selon la technique d'inversion de phase en température, s'avère apte à interagir avec une microémulsion annexe de caractère eau-dans-huile et contenant au niveau de sa phase hydrophile ou encore polaire au moins un actif hydrophile, de manière à former une architecture de type microémulsion contenant ledit actif, au niveau de sa structure micellaire hydrophile interne.

De manière surprenante, l'interaction requise selon l'invention entre les deux microémulsions ne porte pas préjudice en terme de stabilité, aux microdomaines polaires ou encore structures micellaires contenant l'actif hydrophile présent dans la première microémulsion. Ces microdomaines se retrouvent internés dans des gouttelettes d'huiles dédiées à former le cœur lipidique liquide des nanocapsules lors de la trempe.

15 MICROEMULSIONS

Tout d'abord, il importe de noter qu'une microémulsion est différente d'une mini- ou nano-émulsion et d'une macroémulsion notamment telles qu'illustrées dans les brevets US 5,961,971 et US 5,576,016, et qui sont des systèmes qualifiés de biphasiques. 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. Ainsi, les microémulsions présentent des microdomaines pas nécessairement sphériques, de petites dimensions, typiquement de l'ordre de 10 à 50 nm, fluctuant dans le temps et dans l'espace.

25 En d'autres termes, les microémulsions ne sont pas des émulsions constituées de mini-gouttelettes. On ne peut y distinguer la phase dispersée de la phase continue. Enfin, contrairement aux macro/mini/nano-émulsions, elles sont thermodynamiquement stables. De telles microémulsions sont notamment décrites dans (Patel *et al.*, « *J. Agric. Food Chem.* » 2006, 54, 7817-7824.

30 L'homme de l'art sait que la formulation des microémulsions se ramène au choix des valeurs de deux types de variables : les variables de composition et les variables de formulation physico-chimique.

On appelle « variables de composition » les proportions relatives des constituants principaux du système : le système tensioactif, la phase hydrophile ou polaire et la phase huileuse.

Les variables dites de formulation physico-chimique incluent pour leur part, tous les autres paramètres, physiques (température, pression) ou chimiques (nature des constituants principaux et des additifs) susceptibles d'influer sur le système.

Pour ajuster ces paramètres nécessaires à la formation de la microémulsion attendue, une technique usuelle est d'élaborer un diagramme de phase correspondant.

Un tel diagramme peut être élaboré selon diverses méthodes dont la plus simple consistant à titrer un mélange de deux composants considérés avec le troisième composant. La figure 1, extraite de l'article de Prapaporn Boonme ; « *Journal of Cosmetic Dermatology* », 2007, 6, 233-228, illustre un exemple de diagramme de phase ternaire d'un système de microémulsion.

Une fois le diagramme de phases établi, la zone de microémulsion est identifiée et une microémulsion peut être facilement préparée en mélangeant simplement les composants requis dans un des rapports spécifiques existant dans cette zone de microémulsion.

Comme il ressort de ce diagramme, la microstructure d'une microémulsion peut être décrite comme ayant un caractère huile-dans-eau (H/E), bicontinue, ou eau-dans-huile (E/H) selon la quantité relative de chacun des composés présents.

Il est également connu de caractériser ces systèmes par le rapport R de Winsor qui qualifie les interactions des molécules de tensioactifs localisées à l'interface avec les molécules voisines de la phase huileuse et de phase hydrophile selon l'équation :

$$- R = A_{SH}/A_{SE}$$

avec A désignant les interactions moléculaires par unité d'aire interfaciale et

E, H, S étant les indices se référant respectivement à la phase hydrophile, à la phase huileuse et au tensioactif.

Suivant que le rapport R est inférieur, supérieur, ou égal à l'unité, on obtient des diagrammes de phase caractéristiques appelés diagrammes de Winsor I, II ou III, tels que représentés sur la figure 2. Par ailleurs, les phases monophasiques claires de ces diagrammes sont qualifiées de microémulsions Winsor IV. Dans la plupart des cas, les

limites de la zone de ce type de microémulsions sont signalées par la manifestation d'une solution trouble.

Ainsi, à partir d'une certaine concentration en tensioactifs, comprise entre 10 % et 50 %, la zone polyphasique disparaît et le tensioactif « co-solubilise » la phase hydrophile et la phase huileuse sous forme de structures plus ou moins organisées telles que des microémulsions ou des phases cristallines liquides (zone monophasique). Les lignes tracées dans la zone biphasique représentée sur cette figure 2 sont appelées lignes de conjugaison ou de partage.

L'inclinaison des lignes de conjugaison indique que la plus grande partie du tensioactif se trouve dans la phase aqueuse dans le cas de Winsor I et dans la phase huileuse dans le cas de Winsor II.

Dans le cas du diagramme Winsor III, il existe une zone inscrite dans un triangle où le système se sépare en trois phases : une microémulsion contenant pratiquement tout le tensioactif et deux autres phases constituées dans la phase hydrophile et de la phase huileuse.

En revanche, à forte concentration en tensioactifs, on observe toujours une zone monophasique à laquelle on se réfère en parlant d'un comportement de type Winsor IV. En d'autres termes, une représentation de type Winsor IV correspond à la partie monophasique de l'un des diagrammes Winsor I, II et III de la figure 2.

Microémulsion contenant l'actif hydrophile

Comme précisé précédemment, la première microémulsion peut comprendre au moins une phase grasse huileuse, au moins un tensioactif lipophile, une phase polaire ou hydrophile, et contenir au niveau de sa phase polaire ou hydrophile au moins un actif à caractère hydrophile, en particulier un actif hydrosoluble, voire hydrodispersible.

Selon un mode de réalisation préféré, cette microémulsion possède par ailleurs un comportement de type Winsor IV.

Avantageusement, cette microémulsion possède un caractère eau-dans-huile.

a-Phase huileuse

La phase 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.

5 L'ester d'acide gras peut être plus particulièrement choisi parmi les esters d'acides gras en C₄ à C₁₈, en particulier en C₈ à C₁₂, et plus particulièrement en C₈ à C₁₀, et notamment parmi le tributyrine, le palmitate d'éthyle, l'oléate d'éthyle, le myristate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, le myristate d'octyldodécyle et leurs mélanges.

10 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 15 triglycérides à chaîne moyenne (MCT) est un triglycéride dans lequel la chaîne carbohydrate a 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 20 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).

25 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.

30 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[®] ou Labrafac[®] CC.

b-Phase hydrophile ou polaire

5 En ce qui concerne la phase hydrophile ou polaire, elle peut être aqueuse ou non. Ainsi, elle peut être formée en tout ou partie d'eau, en tout ou partie d'au moins un solvant polaire, ou d'un mélange eau/solvant polaire.

Avantageusement, la phase hydrophile est constituée uniquement d'eau.

10 Selon un autre mode de réalisation, la phase hydrophile peut être exempte d'eau. En ce cas, elle peut être formée d'au moins un solvant hydrophile. Un tel solvant polaire est choisi pour sa capacité à solubiliser l'actif considéré, et au regard de l'application visée (chez l'homme ou l'animal) pour son innocuité. Ainsi, l'homme de l'art est à même de choisir un tel solvant.

15 De tels solvant polaires peuvent par exemple être choisis parmi les polypropylènes glycol, le propylène glycol, l'éthanol, l'isopropanol, le glycérol, le glycofurol, les polyéthylènes glycols de faible poids moléculaire, les polyols, et leurs mélanges. Par exemple, une telle phase hydrophile peut être constituée uniquement de propylène glycol [Patel *et al*, « *J. Agric. Food Chem.* » 2006, 54, 7817-7824].

20 Selon une autre variante de réalisation, la phase hydrophile peut être formée en tout ou partie d'eau.

Plus particulièrement, il peut s'agir d'un mélange eau/solvant(s) polaire(s), lesdits solvants polaires étant tels que définis précédemment.

25 Il est entendu que certains solvants polaires peuvent détenir par ailleurs des propriétés tensioactives. Il pourra être alors nécessaire de prendre en compte celles-ci lors de l'élaboration de la microémulsion. Le solvant considéré aura alors une double fonction, celle de solvant et de co-tensioactif, voire, dans certains cas, une fonction pour l'essentiel co-tensioactive.

Selon un mode de réalisation particulier, un tel mélange peut comprendre de 0,1 % à 50 % d'eau et de 50 % à 99,9 % d'au moins un solvant polaire.

30 Selon un autre mode de réalisation particulier, un tel mélange peut comprendre de 0,1 % à 50 % d'au moins un solvant polaire et de 50 % à 99,9 % d'eau.

Selon un autre mode de réalisation, un tel mélange peut être un mélange eau/propylène glycol, pouvant être formé de 10 % à 45 % d'eau, de préférence de 15 % à 35 %, tout particulièrement de 20 % à 30 % d'eau, voire d'environ 25 % d'eau, et de 50 % à 95 % de propylène glycol, de préférence de 55 % à 85 %, tout particulièrement de 70 % à 80 %, voire d'environ 75 % de propylène glycol.

Selon un autre mode de réalisation particulier, il s'agit d'un mélange équimolaire.

Selon un autre mode de réalisation, la phase hydrophile peut en outre comprendre un co-tensioactif, notamment à caractère hydrophile. De tels co-tensioactifs sont bien connus de l'Homme de l'art. Il peut par exemple s'agir d'alcools longs, du butanol, du pentanol, de l'hexanol, et leurs mélanges. D'autres exemples sont cités dans Patel *et al.* (*ibid*).

Il est entendu que cette première microémulsion peut comprendre en outre le cas échéant un actif dit lipophile en particulier liposoluble voire lipodispersible. Celui-ci sera alors interné au niveau de sa phase lipidique.

c- Tensioactifs

Comme précisé précédemment, la première microémulsion contenant au moins un actif hydrophile est stabilisée par au moins un tensioactif lipophile.

Pour des raisons évidentes, la nature du tensioactif nécessaire à la stabilisation de la microémulsion est directement liée à la nature chimique des phases hydrophile et lipophile mises en présence.

Ainsi, dans le cas d'une mise en présence d'une phase hydrophile formée pour l'essentiel d'un solvant à l'image du propylène glycol, la microémulsion correspondante peut être efficacement stabilisée par un unique tensioactif de nature lipophile.

En revanche, dans le cas où la phase hydrophile comprend de l'eau en association ou non avec un solvant polaire annexe, il peut être nécessaire d'associer au tensioactif lipophile un co-tensioactif.

Le tensioactif lipophile peut être solide ou non à température ambiante.

Le tensioactif lipophile mis en œuvre selon la présente invention est plus particulièrement à base de phospholipides qui sont avantageux au regard de leur caractère biocompatible.

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

D'autres phospholipides peuvent être le phosphatidylglycérol, le phosphatidylinositol, la phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique et la
5 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 :

10 - 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
15 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
20 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
25 contient environ 69 % de phosphatidylcholine et 9 % de phosphatidyléthanolamine. Ce constituant est le seul constituant solide à 37 °C et à température ambiante dans la formulation.

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

On peut aussi mettre en œuvre, au titre de tensioactif liposoluble convenant à
30 la présente invention, les sucro-esters tels que les esters d'acide gras et de saccharose, les esters d'alkyl glucose, en particulier les esters gras de C₁-C₆ alkyl glucose polyoxyéthylénés, et leurs mélanges.

On peut plus particulièrement citer le mono- ou di-stéarate de sucrose et les polystéarates de sucrose ayant notamment une proportion élevée en monostéarate de sucrose.

Pour des raisons évidentes, les proportions en phase huileuse, phase
5 hydrophile, et tensioactif sont à ajuster, au regard de la nature chimique des composés spécifiques mis en œuvre, pour obtenir une microémulsion. Cet ajustement est réalisé *via* l'établissement d'un diagramme de phase, dont l'élaboration relève clairement des compétences de l'Homme de l'art. L'exemple 1, présenté ci-après, propose un mode de réalisation spécifique de formation d'une telle émulsion. Par ailleurs, les figures 3 et 4, qui
10 rendent compte chacune d'un exemple de diagramme de phase, illustrent plusieurs exemples de premières microémulsions.

Selon un mode de réalisation, la première microémulsion est formée d'au moins un triglycéride d'acide gras, d'une lécithine, d'un dérivé 2-hydroxystéarate de polyéthylène glycol et d'un actif hydrophile.

15 La première microémulsion peut être réalisée à des températures variables, directement dépendantes du choix des composants requis pour former son architecture de microémulsion, à savoir la phase huileuse, la phase hydrophile ou polaire et les tensioactifs.

Il est à noter que la phase hydrophile contenant l'actif hydrophile, forme, au
20 sein de la microémulsion, des microdomaines dont la taille peut être précisément ajustée à travers la température retenue pour former cette microémulsion. Cette taille est avantageusement inférieure à 50 nm.

d-Actif

25 Comme indiqué précédemment, le procédé est particulièrement avantageux pour internaliser, au sein des nanocapsules à cœur lipidique, un actif hydrophile, c'est-à-dire hydrosoluble ou hydrodispersible.

Selon une variante préférée de réalisation, cet actif est hydrosoluble.

Cet actif hydrophile est formulé selon l'invention via la première
30 microémulsion eau-dans-huile qui l'intègre au niveau de sa structure micellaire hydrophile.

Autrement dit, l'actif à caractère hydrophile, voire hydrosoluble, est contenu dans des microdomaines de nature polaire ou hydrophile, stabilisés par au moins un tensioactif lipophile dans la phase huileuse.

5 Son incorporation préalable au sein de cette première microémulsion est réalisée par solubilisation dudit actif dans la phase hydrophile destinée à former la microémulsion.

Parallèlement, les tensioactifs dont au moins un tensioactif lipophile et la phase huileuse sont préalablement mélangés et une fois les tensioactifs solubilisés dans l'huile, les deux phases huileuse et aqueuse sont mises en présence.

10 L'ensemble est chauffé à une température propice à la réalisation de la microémulsion attendue.

Cette température varie de la température ambiante à 75 °C.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, dans le procédé objet de la présente invention, la première microémulsion considérée pour le mélange est, lors du
15 mélange, à une température variant de la température ambiante à 75 °C.

Cette température est généralement ajustée pour permettre un mélange homogène de l'ensemble des constituants. Cet ajustement est en particulier conseillé lorsque l'un des composés est solide à température ambiante à l'image par exemple de
20 certains tensioactifs phospholipidiques. Ainsi, la mise en œuvre de lipoïd[®] S75-3 à titre de tensioactif, pour former la microémulsion, impose de chauffer le mélange à une température supérieure à 72 °C, c'est-à-dire la température de fusion du lipoïd[®].

La température du mélange peut être avantageusement maintenue jusqu'à l'introduction dans la seconde microémulsion.

Toutefois, l'ensemble peut le cas échéant être également placé à température
25 ambiante ou à l'étuve à 37 °C jusqu'à obtention de la limpidité. Ce mode de réalisation s'avère tout particulièrement avantageux dans le cas d'actifs à caractère hydrophile thermosensibles.

Bien entendu, le procédé selon l'invention est également compatible avec la
30 formulation d'actif(s) lipophile(s), c'est-à-dire liposoluble(s) ou lipodispersible(s).

Cet actif lipophile peut être introduit *via* la structure micellaire lipidique de la première ou seconde microémulsion.

Avantageusement, lorsqu'il est lipophile, l'actif est introduit *via* la seconde microémulsion.

Les actifs considérés selon l'invention peuvent être un composé pharmaceutiquement actif, cosmétiquement actif ou actif dans un domaine phytosanitaire ou alimentaire.

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

Un tel actif peut être également de nature protéique ou 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 un fluide pouvant se transformer en gaz.

Deuxième microémulsion

Comme précisé précédemment, la seconde microémulsion est stabilisée par au moins un tensioactif hydrophile thermosensible.

Elle peut être à caractère eau-dans-huile (partie droite de la zone d'inversion de phase ou ZIP) ou huile-dans-eau (partie gauche de la ZIP).

Avantageusement, elle est de type eau-dans-huile.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier de la présente invention, la seconde microémulsion, avant mélange, est une microémulsion eau-dans-huile.

Les tensioactifs émulsionnants habituellement utilisés 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'huile dispersées.

Ils sont généralement qualifiés de tensioactifs thermosensibles, hydrophiles et non ioniques.

Le choix d'un tel tensioactif s'avère particulièrement avantageux pour garantir l'opération d'inversion de phase par variation de température, conduisant à une architecture de microémulsion.

Ainsi, ce type de tensioactif, utilisé dans la seconde microémulsion selon l'invention, voit sa solubilité dans l'huile augmentée avec l'augmentation de la température. Le HLB de tels tensioactifs peut varier de 8 à 18, de préférence de 10 à 18,

notamment de 10 à 16. Selon un mode de réalisation de l'invention, de tels 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 et leurs dérivés éthoxylés, et leurs mélanges.

5 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
10 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 (Cetareth-9 à Cetareth-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
15 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
20 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
25 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.

30 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 et de diglycérade 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[®]).

5 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).

Selon un autre mode de réalisation, la seconde microémulsion considérée selon la présente invention peut, en outre, contenir un co-tensioactif. Plus
10 particulièrement, ce co-tensioactif est à caractère lipophile.

Il est à noter que la taille des particules de la microémulsion diminue quand la proportion en agent tensio-actif hydrophile augmente et quand la proportion en agents tensioactifs (hydrophile et lipophile) augmente. En effet, l'agent tensio-actif hydrophile entraîne une diminution de la tension interfaciale et donc une stabilisation du système ce
15 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 de 1 à 4 % d'un sel notamment inorganique comme par exemple
20 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.

25 Selon un mode de réalisation particulier, la première microémulsion contenant l'actif selon l'invention peut également contenir un tel sel, de manière à maintenir, si nécessaire, la même osmolarité, lors de l'introduction de la première microémulsion dans la seconde.

Selon un mode de réalisation particulier, la seconde microémulsion contient
30 avantageusement de 5 à 15 % de tensio-actif(s) hydrophile(s), de 5 à 15 % d'une phase huileuse, associé le cas échéant à 1 à 3 % de tensio-actif(s) lipophile(s) et de 64 à 89 %

d'une phase aqueuse (les pourcentages sont exprimés en poids par rapport au poids total de la microémulsion).

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 le Solutol®
5 HS15.

Une microémulsion convenant tout particulièrement à l'invention est accessible selon la technique d'inversion de phase, en particulier par une opération d'inversion de phase en température à partir d'une émulsion huile-dans-eau, stabilisée par le système tensioactif considéré pour la microémulsion. Cette technologie est plus
10 particulièrement décrite dans le brevet EP 1 265 698 dont le contenu est intégré à la présente demande.

La seconde microémulsion est généralement obtenue en maintenant une agitation mécanique constante.

Ainsi, l'ensemble des constituants destinés à former la seconde microémulsion
15 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 T_2 , c'est-à-dire jusqu'à l'obtention d'une phase blanche plus visqueuse qui indique l'obtention de l'émulsion inverse (E/H). Le chauffage est alors
20 stoppé et l'agitation maintenue jusqu'à retour à la température ambiante, en passant par la température d'inversion de phase T_1 , c'est-à-dire la température à laquelle se forme la microémulsion attendue, sous la forme d'une phase transparente ou translucide. Lorsque la température est redescendue en dessous de la zone d'inversion de Phase en Température (T_1), on obtient une émulsion huile-dans-eau.

25 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
30 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
5 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 cas échéant, il est possible de reproduire un ou plusieurs cycles de température autour de la zone d'inversion de phase entre T_1 et T_2 , jusqu'à observer une
10 suspension translucide, qui correspond à la formation d'une nouvelle microémulsion. On stabilise alors le système à une température qui correspond à la structuration du système en la nouvelle microémulsion attendue.

Selon une variante de réalisation, la seconde microémulsion de l'étape ii) peut subir préalablement à sa mise en contact avec la première microémulsion au moins une
15 opération d'inversion de phase en température.

Plus particulièrement, cette opération d'inversion de phase comprend au moins les étapes consistant à :

- augmenter la température de la seconde microémulsion, jusqu'à une température T_2 supérieure à sa température d'inversion de phase (TIP) pour obtenir
20 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
25 voisinage de l'inversion de phase pour former une nouvelle microémulsion obtenue par inversion de phase.

En ce qui concerne la phase huileuse susceptible d'être mise en œuvre pour préparer cette seconde microémulsion, elle peut être formée à partir des huiles proposées
ci-dessus pour la première microémulsion. Cette phase huileuse peut être identique ou non
30 à celle formant la première microémulsion.

Avantageusement, dans le procédé selon l'invention, la phase huileuse de chacune des deux microémulsions comprend au moins un triglycéride, un ester d'acide gras ou l'un de leurs mélanges.

Avantageusement, la seconde microémulsion peut incorporer un principe actif de nature lipophile. Dans ce cas, les nanocapsules obtenues à l'issue du procédé selon l'invention incorporeront au niveau de leur cœur lipidique liquide au moins un actif hydrophile et au moins un actif liposoluble.

Formation des nanocapsules

Comme signalé précédemment, la formation des nanocapsules attendues impose d'introduire la première microémulsion telle que définie ci-dessus à la seconde microémulsion.

Pour des raisons évidentes, cette étape est réalisée dans des conditions compatibles avec le maintien des première et seconde microémulsions sous une forme stabilisée.

Plus précisément, la seconde microémulsion doit être à une température compatible avec le maintien de son architecture de microémulsion. Généralement cet état de stabilité est atteint à une température comprise dans sa zone d'inversion de phase, à savoir entre 60 °C et 90 °C, en particulier entre 65 °C et 85 °C, tout particulièrement entre 70 °C et 75 °C, voire de l'ordre de 72 °C.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, dans le procédé selon l'invention, la seconde microémulsion considérée pour le mélange est, lors du mélange, à une température variant entre 60 °C et 90 °C, de préférence entre 65 °C et 85 °C, tout particulièrement entre 70 °C et 75 °C, voire de 72 °C.

Pour des raisons de stabilité accrue, la seconde microémulsion est avantageusement maintenue à une température se situant dans la gamme haute de la zone d'inversion de phase, c'est-à-dire à une température supérieure à 75 °C, notamment entre 75 °C et 85 °C.

Selon la température d'inversion de phase retenue pour la seconde microémulsion, il peut être privilégié une architecture de microémulsion de type eau-dans-huile ou de type huile-dans-eau.

Pour ce qui est de la première microémulsion incorporant au moins un actif hydrophile, sa température peut également varier au regard de la température requise pour accéder à cette structure de microémulsion, compte-tenu des différents composants considérés pour la former.

5 En conséquence, les deux microémulsions peuvent être mises en présence, soit en étant toutes deux portées à la même température ou à des températures voisines, soit en étant respectivement à deux températures distinctes.

Au sens de la présente invention, on qualifie de « températures voisines », deux températures dont les valeurs ne diffèrent l'une de l'autre qu'au plus de 5 %.

10 Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, dans le procédé objet de l'invention, les deux microémulsions mises en présence possèdent ou non la même température.

Selon la première alternative, la température considérée est généralement proche de, voire, celle requise pour accéder à un état de microémulsion pour la seconde
15 microémulsion ou encore celle correspondant à une température d'inversion de phase de la seconde microémulsion.

Comme précisé ci-dessus, la première microémulsion peut être, pour sa part, réalisée sur une gamme de température plus large, directement dépendante du choix des composants requis pour la former.

20 Ainsi, cette première microémulsion peut être réalisée entre 20 et 80 °C, voire à 37 °C ou à la température ambiante.

Au sens de la présente invention, on entend par « température ambiante » une température de l'ordre de 25 °C.

Ce mode de réalisation à une température variant de la température ambiante à
25 37 °C, notamment à température ambiante, est tout particulièrement avantageux pour l'encapsulation d'actif thermosensible.

A titre d'exemple d'un mode de réalisation particulier d'un procédé selon l'invention on peut notamment citer celui consistant à mettre en présence une première microémulsion formée d'une phase huileuse contenant du Labrafac[®], stabilisée par un
30 tensioactif lipophile tel que le Lipoïd[®] et d'une phase hydrophile comportant uniquement du propylène glycol ou comprenant un mélange eau/propylène glycol dans un rapport 1:3, et une seconde microémulsion formée d'eau, Labrafac[®] et NaCl, stabilisée par un

tensioactif hydrophile thermosensible tel que le Solutol[®] et dont la température retenue pour la former est généralement une température d'environ 70 °C, par exemple 72 °C. On pourra alors privilégier un chauffage de la première émulsion à une température pouvant être comprise entre 65 °C et 80 °C, notamment entre 70 °C et 75 °C, par exemple 72 °C.

- 5 Les deux microémulsions seront dans ce cas portées à une même température ou des températures voisines lorsqu'elles seront mises en présence.

Quoiqu'il en soit, il est à noter que la mise en présence d'une première microémulsion contenant un actif dit thermosensible avec une seconde microémulsion, nécessitant pour sa part d'être par exemple à une température d'au moins 65 °C pour
10 stabiliser son architecture de microémulsion, n'est pas préjudiciable à la stabilité dudit actif. En effet, la trempe effectuée immédiatement après l'étape de mélange, minimise efficacement le temps de contact de cet actif avec une telle température.

Le mélange des deux microémulsions considérées selon la présente invention
15 s'effectue généralement sous agitation mécanique pour obtenir une homogénéisation des deux microémulsions.

Avantageusement, les deux microémulsions mélangées à l'étape iii) du procédé selon l'invention sont présentes dans un rapport pondéral propice à la stabilité de la seconde microémulsion.

20 Plus particulièrement, les deux microémulsions selon la présente invention sont mises en présence dans un rapport pondéral deuxième microémulsion/première microémulsion contenant l'actif, propice à la stabilité de la deuxième émulsion en particulier compris entre 2 et 20, de préférence entre 3 et 15, voire de l'ordre de 5.

La fusion des deux microémulsions ou encore leur homogénéisation peut être
25 visualisée à l'œil nu (solution limpide).

La nouvelle architecture microémulsion ainsi formée subit consécutivement une trempe selon l'invention.

Cette étape destinée à former les nanocapsules selon l'invention consiste en un refroidissement brusque de l'architecture microémulsion à une température propice à la
30 solidification des films interfaciaux composant la microémulsion. Cette température est généralement très inférieure à la température d'inversion phase de la seconde microémulsion. Le refroidissement est avantageusement réalisé sous agitation magnétique.

Par exemple, on peut effectuer la trempe de ladite microémulsion chargée en un ou plusieurs actifs à une température au moins 30 °C inférieure à la TIP de la seconde émulsion (Température d'Inversion de Phase) au moment du trempage.

5 Cette trempe peut être effectuée en diluant le milieu de 3 à 10 fois à l'aide d'eau dé-ionisée à 2 °C \pm 1 °C jetée dans la microémulsion fine. Les nanocapsules obtenues sont alors maintenues sous agitation pendant 5 minutes.

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-transparent à blanc-translucide avec effet Tyndall (reflets bleutés). Ce changement
10 se produit à une température inférieure à la TIP. Cette température est située généralement entre 6 et 15 °C en dessous de la TIP.

A l'issue du procédé selon l'invention, des nanocapsules chargés en au moins un actif selon l'invention sont obtenues.

Au sens de l'invention, l'expression « chargées en un actif » signifie que les
15 nanoparticules obtenues à l'issue du procédé selon l'invention, internalisent au moins un actif à caractère hydrophile selon l'invention au niveau de leur cœur lipidique liquide.

Comme précisé ci-dessus, le procédé considéré selon l'invention est particulièrement intéressant pour charger facilement et rapidement au sein d'un cœur lipidique d'une microémulsion, un actif hydrophile, processus qui n'est pas accessible par
20 des procédés conventionnels.

L'actif hydrophile est contenu dans le cœur lipidique sous la forme d'une structure micellaire hydrophile ou encore d'une microémulsion à caractère eau-dans-huile, comprenant une phase huileuse stabilisée par au moins un tensioactif lipophile et une phase hydrophile incorporant ledit actif.

25 Les nanocapsules de l'invention conviennent plus particulièrement pour l'administration des principes actifs suivants : les antiseptiques, les protéines dont celles impliquées dans le phénomène de coagulation, les peptides, les plasmides d'ADN, les ARNsi, les anti-infectieux tels que par exemple les antimycosiques, les antibiotiques, les anticancéreux, les immunosuppresseurs, les principes actifs destinés au Système Nerveux
30 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.

L'encapsulation d'actif selon l'invention dans les nanocapsules selon l'invention peut être mesurée par évaluation du rendement d'encapsulation.

Le rendement d'encapsulation RE (en %) des nanocapsules obtenues selon la présente invention correspond à la proportion d'actif présente dans les nanocapsules par rapport à l'actif total ajouté dans la formulation.

Plus précisément, ce rendement est calculé selon la formule suivante:

$$RE (\%) = \frac{\text{quantité d'actif dans les nanocapsules} \times 100}{\text{quantité d'actif dans les nanocapsules} + \text{quantité d'actif libre}}.$$

Le dosage de l'actif selon l'invention internalisé peut être mesuré par spectrophotométrie, par exemple à l'aide d'un spectrophotomètre qui mesure la densité optique à une longueur d'onde de 633 nm.

Avantageusement, ce RE est d'au moins 10 %, en particulier compris entre 15 % et 35 %, plus particulièrement compris entre 35 % et 100 %, de préférence entre 35 % et 80 %, en particulier entre 40 % et 60 %, voire de 50 %.

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 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 la méthode de spectroscopie à corrélation de photons.

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

Au sens de l'invention, l'expression « essentiellement lipidique » signifie que le noyau formant les nanocapsules selon l'invention est constitué à plus de 50 % en poids, en particulier à plus de 75 % en poids, notamment à plus de 80 % en poids, voire plus de
10 90 %, plus particulièrement plus de 95 % de son poids respectif, voire en totalité d'un ou plusieurs composés lipidiques (hydrophobes)

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

Ainsi, la présente invention vise également des nanocapsules à cœur lipidique
15 liquide et écorce solide et chargées au sein de leur cœur lipidique en au moins un actif à caractère hydrophile, en particulier hydrosoluble, ledit actif y étant présent sous la forme d'une microémulsion à caractère eau dans huile, comprenant une phase huileuse stabilisée par au moins un tensioactif lipophile et une phase hydrophile incorporant ledit actif.

Selon un mode de réalisation préféré, ledit actif y est présent sous une forme
20 distincte d'un système micellaire inverse.

La présente invention a également pour objet des compositions contenant lesdites nanocapsules. La présente invention est illustrée par les exemples suivants qui sont présentés à titre illustratif et non limitatif du domaine de l'invention.

Il est à noter que :

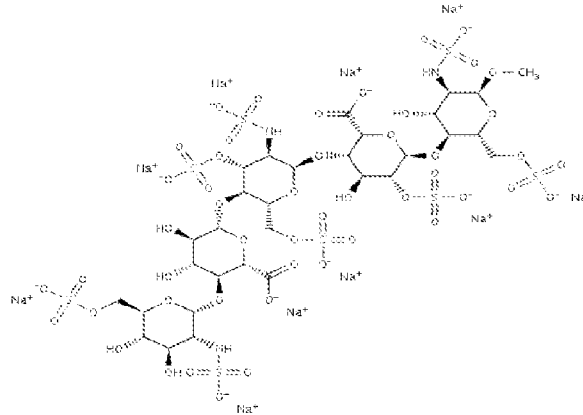
- 25
- PG = propylène glycol,
 - IPP = Isopropyl palmitate.

Exemple 1 : Préparation d'une première microémulsion selon l'invention encapsulant du fondaparinux

Le fondaparinux est un pentasaccharide de formule générale $C_{31}H_{43}N_3Na_{10}O_{49}S_8$ qui suit :

5

10



Sa solubilité dans l'eau est supérieure à 12,5 mg/mL (concentration du fondaparinux dans sa forme commerciale Arixtra®).

Pour la formulation de cette microémulsion, la phase hydrophile est composée uniquement de propylèneglycol (Patel *et al*, *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 7817-7824). La microémulsion est également constituée par une phase huileuse (Labrafac® CC, mélange de triglycérides en C₈ et C₁₀) et un tensioactif liposoluble (Lipoïd® S75-3).

Le protocole général suivant est adopté pour élaborer le diagramme ternaire propylène glycol/Labrafac® CC/ Lipoïd® S75-3, conduisant à la caractérisation des zones monophasiques de type microémulsion, et qui est représenté en figure 3.

Le fondaparinux est solubilisé dans le propylène glycol à 75 °C. Une fois solubilisés, le Lipoïd® S75-3 et Labrafac® CC sont ajoutés et l'ensemble est chauffé à 75 °C pour obtenir une phase limpide qui est maintenue à cette température jusqu'à incorporation dans les nanocapsules lipidiques.

Une microémulsion est notamment formée en associant 185 mg de phase huileuse (Labrafac®), 40 mg de propylène glycol, 40 mg de tensioactif (Lipoïd® S75-3) et 500 µg de fondaparinux.

270 mg d'une microémulsion formée de 70 % en phase huileuse, 15 % en phase hydrophile et 15 % en tensioactif, sont obtenus.

Exemple 2 : formulation de la microémulsion de l'exemple 1 à l'état de nanocapsules lipidiques

Dans un flacon de 20 mL, on mélange 504 mg de Solutol[®] HS15, 44 mg de NaCl, 504 mg de Labrafac[®] CC et 1,538 g d'eau déminéralisée. Trois cycles de
5 température entre 60 °C et 92 °C sont ensuite réalisés. Après la troisième montée en température, le milieu est refroidi à 72 °C. Il correspond à la seconde microémulsion considérée selon l'invention.

200 µL de la microémulsion obtenue selon l'exemple 1 (soit environ 190 mg), portée à cette même température, sont ajoutés sous agitation à cette seconde
10 microémulsion, en une seule fois et rapidement.

Le mélange obtenu garde un aspect transparent.

Une trempe est ensuite réalisée à 70 °C, par ajout de 8 mL d'eau glacée.

La quantité du fondaparinux non encapsulé est déterminé par la méthode spectrophotométrique de complexation avec l'azure A. (Cadene, M. *et al*, « *J. biol.*
15 *Chem.* » 1995, 270, 13204-13209).

Il est ainsi obtenu, une formulation de nanocapsules lipidiques encapsulant le fondaparinux à une concentration d'environ 100 µg de fondaparinux/g de nanocapsules lipidiques, soit un RE d'environ 35 à 40 %.

Exemple 3 : Formulation alternative de nanocapsules chargées en fondaparinux

On prépare dans un premier temps une première microémulsion selon l'invention encapsulant du fondaparinux, par analogie avec le procédé de préparation décrit en exemple 1, mais dans lequel le fondaparinux est préalablement dissous dans 3,5
25 mg d'eau.

On ajoute ensuite 11,5 mg de propylène glycol, la phase polaire résultante étant ainsi constituée par un mélange eau/propylène glycol 1:3. Une fois solubilisé, 37,5 mg de Lipoid[®] S75-3 et 97,5 mg de Labrafac[®] CC sont également ajoutés au mélange précité. L'ensemble est chauffé à 75 °C. Le reste de la procédure est analogue à celle
30 décrite en exemple 1. On obtient 150 mg de microémulsion et celle-ci, chauffée à 75 °C est totalement incorporée dans une seconde microémulsion préparée conformément au protocole décrit dans l'exemple 2 et, pour sa part, à une température de 72 °C.

Les paramètres étudiés pour la mise au point de cette première microémulsion sont les mêmes que ceux indiqués pour l'exemple 1 (figure 4).

Par analogie avec le mode opératoire décrit à l'exemple 2, on ajoute la première microémulsion contenant l'actif selon l'invention à la seconde microémulsion.

5 Il a été obtenu, de manière reproductible, une formulation de nanocapsules lipidiques encapsulant le fondaparinux à une concentration d'environ 50 µg de fondaparinux/g de nanocapsules lipidiques, soit un RE d'environ 15 à 25 %.

Exemple 4 : Formulation alternative de nanocapsules chargées en
10 **fondaparinux**

On prépare dans un premier temps une première microémulsion selon l'invention encapsulant du fondaparinux, par analogie avec le procédé de préparation décrit en exemple 1, mettant en œuvre dans le cas présent 3 mg de fondaparinux, mais dans lequel le fondaparinux est préalablement dissous dans l'eau (15 mg).

15 On ajoute ensuite le Labrafac[®] CC (35 mg), l'Imwitor[®] 308 (35 mg) et le Span[®] 60 (15 mg) et on chauffe l'ensemble à 37° C pour obtenir une microémulsion limpide. Cette microémulsion est conservée à 37 °C jusqu'à son incorporation dans la seconde émulsion.

La seconde microémulsion est préparée selon le protocole décrit à l'exemple 2,
20 à la différence qu'elle est obtenue à une température de 78 °C.

Par analogie avec le mode opératoire décrit à l'exemple 3, on ajoute 71 mg de la première microémulsion à une température de 37 °C contenant l'actif à 1 g de la seconde microémulsion à une température de 78 °C.

Il est ainsi obtenu, une formulation de nanocapsules lipidiques encapsulant le
25 fondaparinux à une concentration d'environ 3000 µg de fondaparinux/g de nanocapsules lipidiques, soit un RE d'environ 100 %.

Ce dosage a été confirmé par un dosage chromogénique de l'activité anti XA.

Exemple 5 : Formulation alternative de nanocapsules chargées en
30 **fondaparinux**

On prépare dans un premier temps une première microémulsion selon l'invention encapsulant du fondaparinux, par analogie avec le procédé de préparation

décrit en exemple 1 mettant en œuvre dans le cas présent 1 mg de fondaparinux, mais dans lequel le fondaparinux est préalablement dissous dans l'eau (10 mg).

On ajoute ensuite le Labrafac[®] CC (37,6 mg), le Tween[®]80 (40 mg) et le Capmul[®] MCM (12,5 mg) et on laisse s'équilibrer l'ensemble à température ambiante pendant quelques heures pour obtenir une microémulsion limpide. Cette microémulsion est conservée à température ambiante jusqu'à son incorporation dans la seconde émulsion.

La seconde microémulsion est conforme à celle décrite à l'exemple 2, à la différence qu'elle est obtenue à une température de 80 °C.

Par analogie avec le mode opératoire décrit à l'exemple 3, on ajoute 83 mg de la première microémulsion contenant l'actif à la température ambiante à 1 g de la seconde microémulsion à une température de 72 °C.

Il est ainsi obtenu, une formulation de nanocapsules lipidiques encapsulant le fondaparinux à une concentration d'environ 350 µg de fondaparinux/g de nanocapsules lipidiques, soit un RE d'environ 35 %.

Ce mode de préparation mettant en œuvre une première microémulsion contenant l'actif à température ambiante est particulièrement avantageux pour l'encapsulation d'actif à caractère hydrophile, voire hydrosoluble thermosensible.

Exemple 6 : Formulation alternative de nanocapsules chargées en fondaparinux

On prépare dans un premier temps une première microémulsion selon l'invention encapsulant du fondaparinux, par analogie avec le procédé de préparation décrit en exemple 1 mettant en œuvre dans le cas présent 1 mg de fondaparinux, mais dans lequel le fondaparinux est préalablement dissous dans l'eau (20 mg).

On ajoute ensuite le Labrafac[®] CC (37,4 mg), le Tween80[®] (35 mg) et le Lipoïd[®] S75 (12,5 mg) et l'ensemble est chauffé à 75 °C pour obtenir une microémulsion limpide, analogue à celle décrite en exemple 1.

La seconde microémulsion est conforme à celle décrite à l'exemple 2, à la différence qu'elle est obtenue à une température de 80 °C.

Par analogie avec le mode opératoire décrit à l'exemple 3, on ajoute 20 mg de la première microémulsion contenant l'actif à 75 °C à 1 g de la seconde microémulsion à 72 °C.

Il est ainsi obtenu, une formulation de nanocapsules lipidiques encapsulant le fondaparinux à une concentration d'environ 100 µg de fondaparinux/g de nanocapsules lipidiques, soit un RE d'environ 50 %.

REVENDICATIONS

1. Procédé utile pour la préparation de nanocapsules à cœur lipidique liquide, écorce solide et chargées en au moins un actif à caractère hydrophile, ledit procédé
5 comprenant au moins les étapes consistant à :

i) disposer d'au moins une première microémulsion à caractère eau-dans-huile, stabilisée par au moins un tensioactif lipophile et contenant au niveau de sa phase hydrophile au moins un actif, à caractère hydrophile,

ii) disposer d'au moins une seconde microémulsion, distincte de la première
10 microémulsion, formulée par inversion de phase d'une émulsion et stabilisée par au moins un tensioactif thermosensible, non ionique et hydrophile,

iii) ajouter ladite première microémulsion dans ladite seconde microémulsion, dans des conditions propices à la formation d'une nouvelle architecture microémulsion dans laquelle ledit actif hydrophile demeure présent au niveau de la phase hydrophile de la
15 première microémulsion, et

iv) effectuer la trempe du mélange formé à l'étape précédente, de manière à obtenir des nanocapsules comprenant ledit actif hydrophile et étant formées d'un cœur lipidique, liquide à température ambiante et enrobé d'un film solide à température ambiante.

2. Procédé selon la revendication précédente dans lequel ledit actif hydrophile
20 est, à l'issue dudit procédé, présent dans le cœur lipidique liquide desdites nanocapsules.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel la seconde microémulsion, avant mélange, est une microémulsion eau-dans-huile.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel la seconde microémulsion considérée pour le mélange est, lors du mélange, à une
25 température variant entre 60 °C et 90 °C, de préférence entre 65 °C et 85 °C, tout particulièrement entre 70 °C et 75 °C, voire de 72 °C.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel la première microémulsion considérée pour le mélange est, lors du mélange, à une température variant de la température ambiante à 75 °C.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel
30 les deux microémulsions mises en présence possèdent la même température.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lequel les deux microémulsions mises en présence possèdent des températures différentes.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel la phase hydrophile de la première microémulsion contenant l'actif est formée en tout ou partie d'eau, en tout ou partie d'au moins un solvant polaire ou d'un mélange eau/solvant polaire.

9. Procédé selon la revendication précédente dans lequel le solvant polaire est choisi parmi les polypropylènes glycol, le propylène glycol, l'éthanol, l'isopropanol, le glycérol, le glycofurol, les polyéthylènes glycols de faible poids moléculaire, les polyols et leurs mélanges.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel le tensioactif lipophile de la première microémulsion est à base de phospholipides.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel la phase huileuse de chacune des deux microémulsions comprend au moins un triglycéride, un ester d'acide gras ou l'un de leurs mélanges.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel la première microémulsion est formée d'au moins un triglycéride d'acide gras, d'une lécithine, d'un dérivé 2-hydroxystéarate de polyéthylène glycol et d'un actif hydrophile.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel le tensioactif thermosensible, non ionique et hydrophile de la seconde microémulsion est choisi parmi un le tensioactif hydrophile possédant un HLB allant de 10 à 18 notamment de 10 à 16.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes 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 et leurs dérivés éthoxylés et leurs mélanges.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel la seconde microémulsion de l'étape ii) subit préalablement à sa mise en contact avec la première microémulsion au moins une opération d'inversion de phase en température.

16. Procédé selon la revendication précédente dans lequel ladite opération d'inversion de phase comprend au moins les étapes consistant à :

- augmenter la température de la seconde microémulsion, jusqu'à une température T_2 supérieure à sa température d'inversion de phase (TIP) pour obtenir
5 une émulsion eau-dans-huile suivie d'une diminution de la température jusqu'à une température T_1 , $T_1 < \text{TIP} < T_2$ 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
10 voisinage de l'inversion de phase pour former une nouvelle microémulsion obtenue par inversion de phase.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel les microémulsions de l'étape iii) sont mélangées dans un rapport pondéral propice à la stabilité de la seconde microémulsion.

15 18. Procédé selon la revendication précédente dans lequel le rapport pondéral deuxième microémulsion/première microémulsion contenant l'actif est compris entre 2 et 20, de préférence entre 3 et 15, voire de l'ordre de 5.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel l'actif est un composé pharmaceutiquement actif, cosmétiquement actif ou actif
20 dans un domaine phytosanitaire ou alimentaire.

20. Nanocapsules susceptibles d'être obtenues selon le procédé décrit dans l'une quelconque des revendications 1 à 19.

21. Nanocapsules à cœur lipidique liquide et écorce solide et chargées au sein de leur cœur lipidique liquide en au moins un actif à caractère hydrophile, en particulier
25 hydrosoluble, ledit actif étant présent dans le cœur lipidique liquide sous la forme de microdomaines hydrophiles ou d'une microémulsion à caractère eau-dans-huile comprenant une phase huileuse stabilisée par au moins un tensioactif lipophile et une phase hydrophile incorporant ledit actif.

FIGURE 1

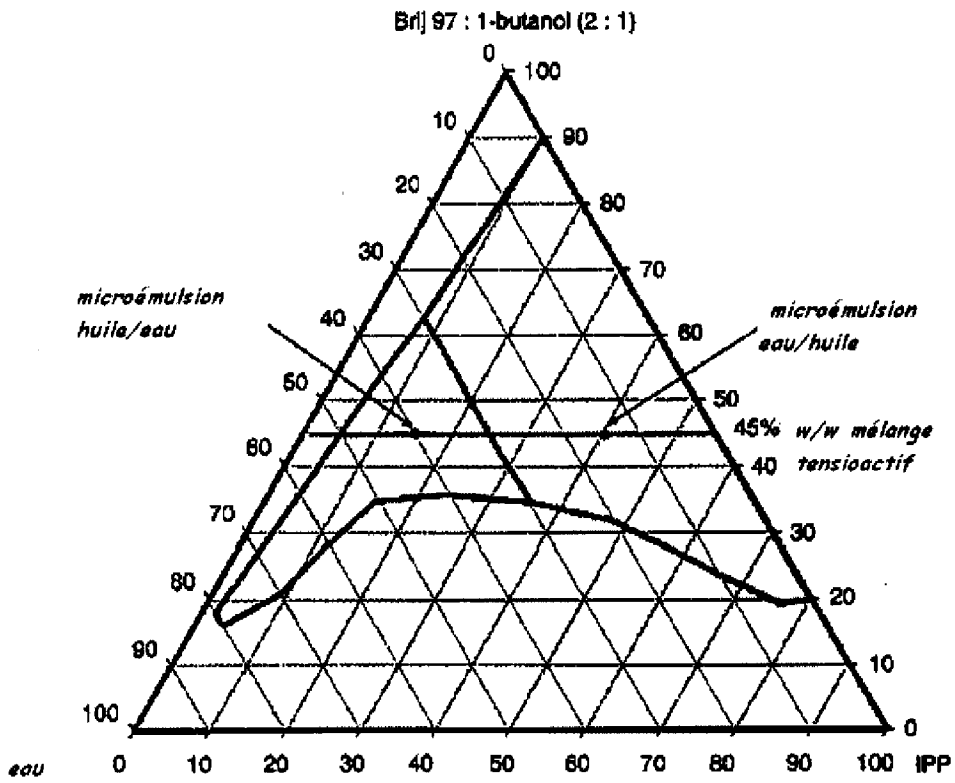
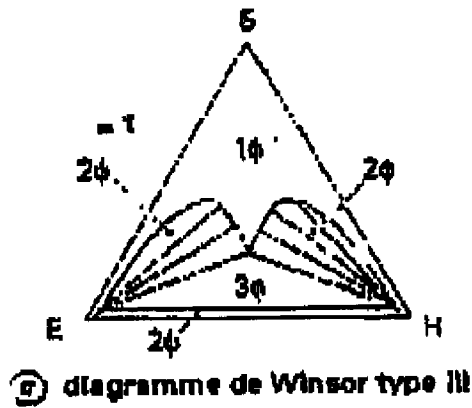
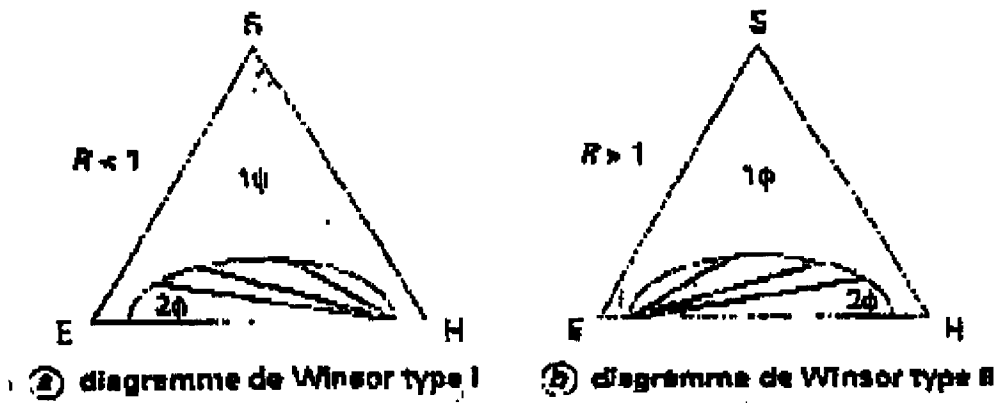


FIGURE 2






-  une phase (1φ)
-  deux phases (2φ)
-  trois phases (3φ)

FIGURE 3

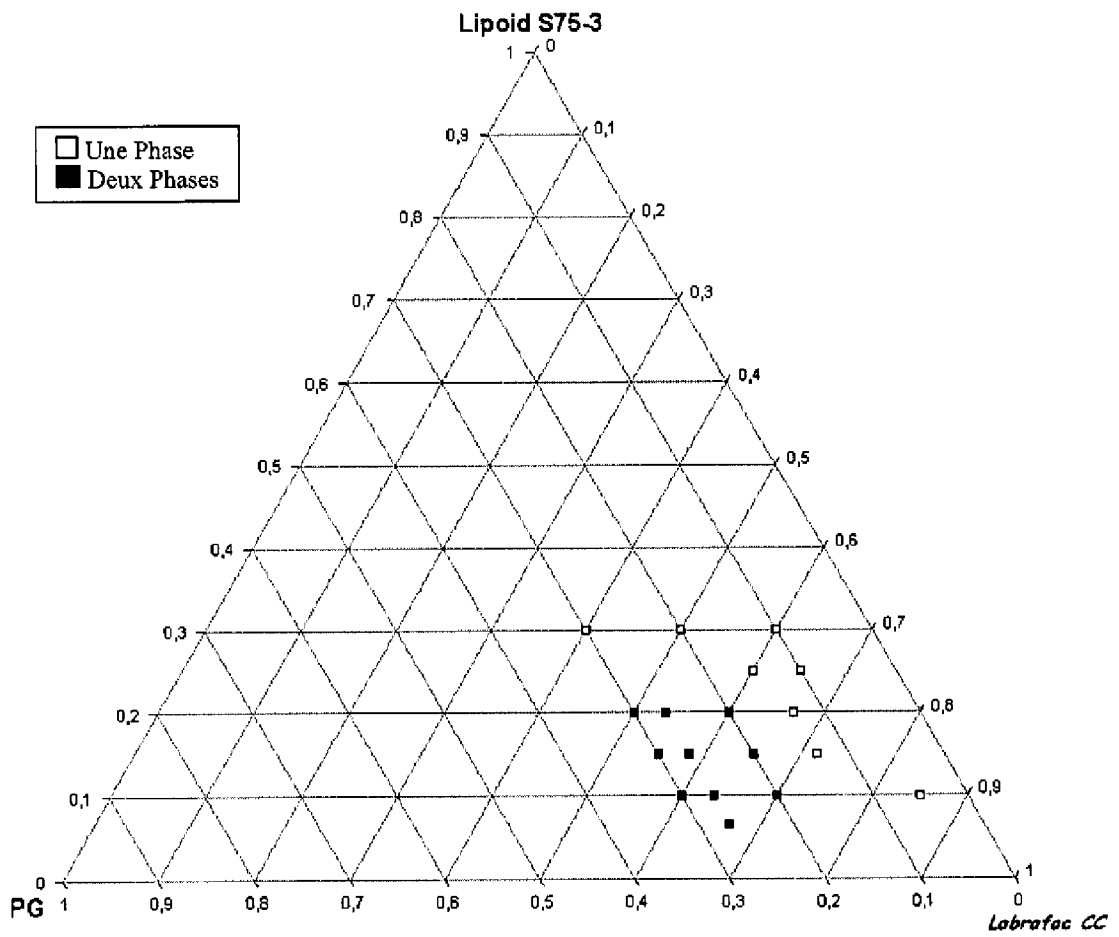
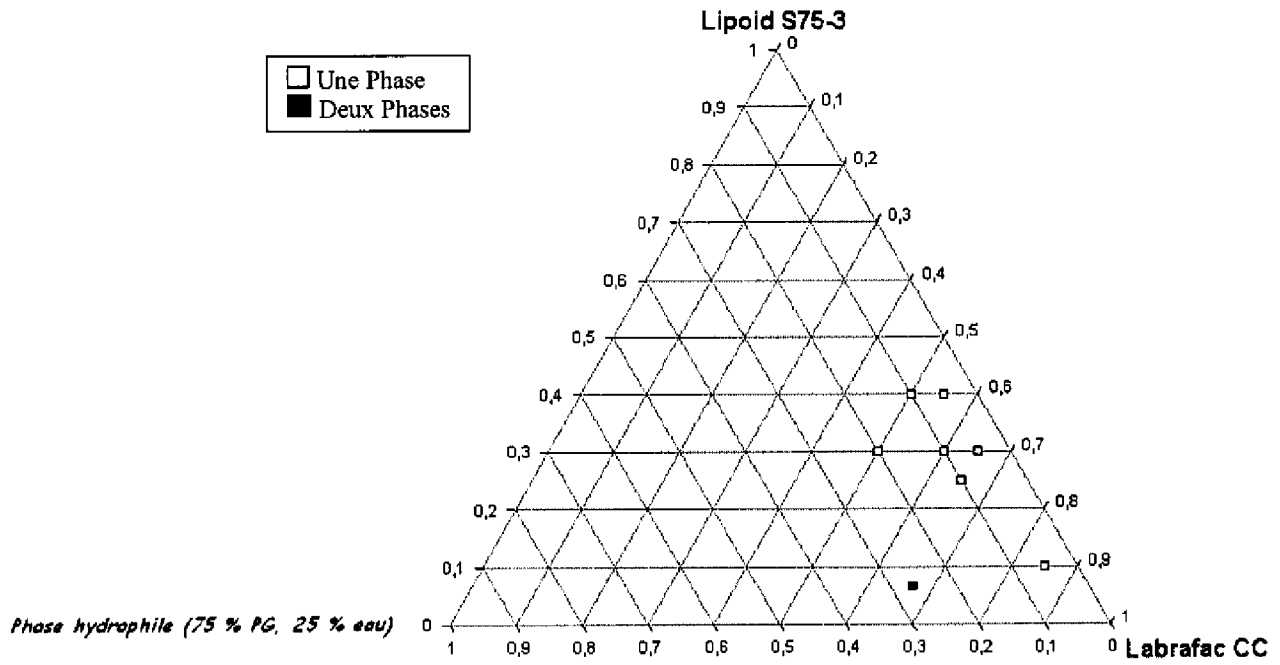


FIGURE 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/052500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. B01J13/04		
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) B01J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/64328 A1 (MAINELAB [FR]; UNIV ANGERS [FR]; HEURTAULT BEATRICE [FR]; SAULNIER PAT) 7 September 2001 (2001-09-07) the whole document	1-21
X,P	WO 2009/004214 A2 (UNIV ANGERS [FR]; SAULNIER PATRICK [FR]; BENOIT JEAN-PIERRE [FR]; ANTO) 8 January 2009 (2009-01-08) claims 1,2,20 page 11, line 6 - line 8	20-21
X,P	WO 2009/001019 A2 (UNIV ANGERS [FR]; SAULNIER PATRICK [FR]; BENOIT JEAN-PIERRE [FR]; ANTO) 31 December 2008 (2008-12-31) claim 1	20-21
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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 22 February 2010		Date of mailing of the international search report 01/03/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tarallo, Anthony

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/052500

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 840 532 A1 (ETHYPHARM SA [FR]) 12 December 2003 (2003-12-12) the whole document -----	1-21
A	WO 03/103822 A2 (ETHYPHARM SA [FR]; HOARAU DIDIER [CA]; DELMAS PASCAL [CA]; LEROUX JEAN) 18 December 2003 (2003-12-18) the whole document -----	1-21
A	EP 1 955 695 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]) 13 August 2008 (2008-08-13) the whole document -----	1-21
A	ARNAUD BÉDUNEAU, E.A.: "Pegylated Nanocapsules Produced by an Organic Solvent-Free Method: Evaluation of their Stealth Properties" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 23, no. 9, 9 August 2006 (2006-08-09) , pages 2190-2199, XP002539233 the whole document -----	1-21
A	BÉATRICE HEURTAULT, E.A.: "A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 19, no. 6, June 2002 (2002-06), pages 875-880, XP002539234 the whole document -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2009/052500
--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0164328	A1	07-09-2001	AT 269154 T	15-07-2004
			AU 4075301 A	12-09-2001
			AU 2001240753 B2	14-04-2005
			BR 0108921 A	21-01-2003
			CA 2401766 A1	07-09-2001
			CN 1419472 A	21-05-2003
			DE 60103863 D1	22-07-2004
			DE 60103863 T2	30-06-2005
			EP 1265698 A1	18-12-2002
			ES 2221640 T3	01-01-2005
			FR 2805761 A1	07-09-2001
			HU 0300209 A2	28-06-2003
			JP 2003525257 T	26-08-2003
			MX PA02008638 A	06-09-2004
			NO 20024181 A	22-10-2002
			PT 1265698 E	30-11-2004
			TR 200401812 T4	21-09-2004
			US 2003152635 A1	14-08-2003
			US 2009238865 A1	24-09-2009
			ZA 200206985 A	07-10-2003
WO 2009004214	A2	08-01-2009	FR 2916974 A1	12-12-2008
WO 2009001019	A2	31-12-2008	FR 2916973 A1	12-12-2008
FR 2840532	A1	12-12-2003	ZA 200500228 A	11-07-2005
WO 03103822	A2	18-12-2003	AU 2003247061 A1	22-12-2003
			BR 0314767 A	26-07-2005
			CA 2488385 A1	18-12-2003
			CN 1658845 A	24-08-2005
			EP 1531800 A2	25-05-2005
			JP 2005532355 T	27-10-2005
			MX PA04012567 A	19-04-2005
			NZ 537393 A	26-01-2007
EP 1955695	A1	13-08-2008	WO 2008096321 A1	14-08-2008

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2009/052500

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. B01J13/04

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)
B01J

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 01/64328 A1 (MAINELAB [FR]; UNIV ANGERS [FR]; HEURTAULT BEATRICE [FR]; SAULNIER PAT) 7 septembre 2001 (2001-09-07) le document en entier	1-21
X,P	WO 2009/004214 A2 (UNIV ANGERS [FR]; SAULNIER PATRICK [FR]; BENOIT JEAN-PIERRE [FR]; ANTO) 8 janvier 2009 (2009-01-08) revendications 1,2,20 page 11, ligne 6 - ligne 8	20-21
X,P	WO 2009/001019 A2 (UNIV ANGERS [FR]; SAULNIER PATRICK [FR]; BENOIT JEAN-PIERRE [FR]; ANTO) 31 décembre 2008 (2008-12-31) revendication 1	20-21
	----- -/--	

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

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 février 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/03/2010

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

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

Fonctionnaire autorisé

Tarallo, Anthony

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2009/052500

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	FR 2 840 532 A1 (ETHYPHARM SA [FR]) 12 décembre 2003 (2003-12-12) le document en entier -----	1-21
A	WO 03/103822 A2 (ETHYPHARM SA [FR]; HOARAU DIDIER [CA]; DELMAS PASCAL [CA]; LEROUX JEAN) 18 décembre 2003 (2003-12-18) le document en entier -----	1-21
A	EP 1 955 695 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]) 13 août 2008 (2008-08-13) le document en entier -----	1-21
A	ARNAUD BÉDUNEAU, E.A.: "Pegylated Nanocapsules Produced by an Organic Solvent-Free Method: Evaluation of their Stealth Properties" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 23, no. 9, 9 août 2006 (2006-08-09), pages 2190-2199, XP002539233 le document en entier -----	1-21
A	BÉATRICE HEURTAULT, E.A.: "A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 19, no. 6, juin 2002 (2002-06), pages 875-880, XP002539234 le document en entier -----	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/052500

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 0164328	A1	07-09-2001	AT	269154 T	15-07-2004
			AU	4075301 A	12-09-2001
			AU	2001240753 B2	14-04-2005
			BR	0108921 A	21-01-2003
			CA	2401766 A1	07-09-2001
			CN	1419472 A	21-05-2003
			DE	60103863 D1	22-07-2004
			DE	60103863 T2	30-06-2005
			EP	1265698 A1	18-12-2002
			ES	2221640 T3	01-01-2005
			FR	2805761 A1	07-09-2001
			HU	0300209 A2	28-06-2003
			JP	2003525257 T	26-08-2003
			MX	PA02008638 A	06-09-2004
			NO	20024181 A	22-10-2002
			PT	1265698 E	30-11-2004
			TR	200401812 T4	21-09-2004
			US	2003152635 A1	14-08-2003
			US	2009238865 A1	24-09-2009
			ZA	200206985 A	07-10-2003
WO 2009004214	A2	08-01-2009	FR	2916974 A1	12-12-2008
WO 2009001019	A2	31-12-2008	FR	2916973 A1	12-12-2008
FR 2840532	A1	12-12-2003	ZA	200500228 A	11-07-2005
WO 03103822	A2	18-12-2003	AU	2003247061 A1	22-12-2003
			BR	0314767 A	26-07-2005
			CA	2488385 A1	18-12-2003
			CN	1658845 A	24-08-2005
			EP	1531800 A2	25-05-2005
			JP	2005532355 T	27-10-2005
			MX	PA04012567 A	19-04-2005
			NZ	537393 A	26-01-2007
EP 1955695	A1	13-08-2008	WO	2008096321 A1	14-08-2008