



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 47/48, 9/51	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/43359 (43) Date de publication internationale: 2 septembre 1999 (02.09.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00418 (22) Date de dépôt international: 24 février 1999 (24.02.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/02429 27 février 1998 (27.02.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOAL- LIANCE PHARMA (S.A.) [FR/FR]; 67, rue Vergniaud, F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MONZA DA SILVEIRA, Airton [BR/BR]; Avenue Sergipe, 247, CEP-91720-110 Porto Alegre, RS (BR). PONCHEL, Gilles [FR/FR]; 46, rue de Fécamp, F-75012 Paris (FR). DUCHENE, Dominique [FR/FR]; 8 bis, rue Laurent Pichat, F-75116 Paris (FR). COUVREUR, Patrick [FR/FR]; 1 bis, rue de Lac Léman, F-91140 Villebon sur Yvette (FR). PUISIEUX, Francis [FR/FR]; 66, rue de Strasbourg, F-94700 Maisons Alfort (FR). (74) Mandataire: BREESE, Pierre; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).	(81) Etats désignés: AU, CA, IL, IN, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: NANOPARTICLES COMPRISING POLYISOBUTYLCYANOACRYLATE AND CYCLODEXTRINS		
(54) Titre: NANOPARTICULES COMPRENANT POLYISOBUTYLCYANOACRYLATE ET CYCLODEXTRINES		
(57) Abstract		
<p>The invention concerns nanoparticles containing at least one active principle, characterised in that they comprise the combination of at least a polymer, preferably a poly(alkylcyanoacrylate) wherein the alkyl group, linear or branched, comprises 1 to 12 carbon atoms and at least a compound capable of complexing said active principle. The invention also concerns the method for preparing said nanoparticles.</p>		
(57) Abrégé		
<p>L'invention a pour objet des nanoparticules contenant au moins un principe actif, caractérisées en ce qu'elles comprennent l'association d'au moins un polymère, de préférence un poly(cyanoacrylate d'alkyle) dans lequel le groupe alkyle, linéaire ou ramifié, comprend de 1 à 12 atomes de carbone, et d'au moins un composé apte à complexer ledit principe actif. L'invention concerne aussi le procédé de préparation de ces nanoparticules.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

NANOPARTICULES COMPRENANT POLYISOBUTYLCYANOACRYLATE ET CYCLODEXTRINES

5

L'invention concerne la délivrance de principes actifs utilisés notamment dans le domaine des médicaments à visée préventive, curative ou diagnostique et également l'amélioration de leur index thérapeutique (amélioration du rapport bénéfices/risques).

10

Elle a plus particulièrement pour objet de nouvelles nanoparticules renfermant au moins un principe actif.

15

La mise au point de nouveaux systèmes de délivrance ou libération de principes actifs a pour objectif premier la délivrance contrôlée d'un agent actif, notamment pharmacologique, à son site d'action à une vitesse et à une posologie thérapeutiquement optimales (1). L'amélioration de l'index thérapeutique peut être obtenue par modulation de la distribution du principe actif dans l'organisme. L'association du principe actif au système de délivrance permet notamment sa délivrance spécifiquement au site d'action ou sa libération contrôlée après le ciblage du site d'action. La réduction de la quantité de principe actif dans les compartiments où sa présence n'est pas souhaitable permet d'accroître l'efficacité dudit principe actif, de réduire ses effets secondaires toxiques, voire même de modifier ou de restaurer son activité.

20

25

30

35

Les systèmes colloïdaux de délivrance de principes actifs comprennent les liposomes, les microémulsions, les nanocapsules, les nanosphères, les microparticules et les nanoparticules. Les nanoparticules présentent des avantages de ciblage, de modulation de

distribution et de souplesse de formulation et ont une structure polymère qui peut être conçue et réalisée de façon adaptée au but poursuivi. Elles se sont révélées tout particulièrement prometteuses pour obtenir un
5 meilleur index thérapeutique au sens défini ci-dessus, en raison de leur aptitude à assurer une libération contrôlée, une délivrance spécifique au site d'action ou délivrance ciblée, permettant à la fois une augmentation de l'efficacité et une réduction des effets secondaires
10 toxiques au niveau des autres organes.

Ce type d'administration nécessite l'emploi de polymères biodégradables. Parmi ceux-ci, les poly(cyanoacrylates d'alkyle) sont particulièrement intéressants car leur bioérosion est observée rapidement
15 par rapport à d'autres polymères biodégradables et se déroule pendant des durées compatibles avec les applications thérapeutiques ou diagnostiques.

Malgré ces caractéristiques intéressantes, la capacité de charge en principes actifs des nanoparticules de poly(cyanoacrylates d'alkyle), exprimée en tant que
20 quantité de principe actif associée à une unité de masse de polymère, est souvent limitée, notamment lorsque le principe actif est très faiblement soluble dans l'eau car la fabrication des nanoparticules utilise des techniques
25 de polymérisation en milieu aqueux. Cette limitation importante de la charge en principe actif s'observe en particulier avec les principes actifs hydrophobes, amphiphiles et/ou insolubles.

L'aptitude relativement faible des
30 nanoparticules conventionnelles à transporter une quantité adéquate de principes actifs du site d'administration au site cible dans l'organisme risque souvent de conduire à la nécessité d'administrer des quantités considérables de polymères.

Les poly(cyanoacrylates d'alkyle) sont utilisés pour produire des nanoparticules en tant que vecteurs de principes actifs (3). Toutefois, pour les raisons évoquées ci-dessus, les faibles charges obtenues, notamment avec les principes actifs hydrophobes, amphiphiles et/ou insolubles dans l'eau en limitent l'usage thérapeutique.

On a maintenant trouvé de façon surprenante qu'il était possible d'élargir le domaine d'utilisation des polymères, en particulier des poly(cyanoacrylates d'alkyle), en leur associant un ou plusieurs composés aptes à complexer des principes actifs et ainsi obtenir de nouvelles nanoparticules possédant des propriétés originales.

L'invention a donc pour objet des nanoparticules contenant au moins un principe actif, caractérisées en ce qu'elles comprennent l'association d'au moins un polymère, de préférence un poly(cyanoacrylate d'alkyle) dans lequel le groupe alkyle, linéaire ou ramifié, comprend de 1 à 12 atomes de carbone, et d'au moins un composé apte à complexer ledit principe actif.

Le composé apte à complexer le principe actif selon la présente invention est de préférence choisi parmi les oligosaccharides cycliques, notamment parmi les cyclodextrines qui peuvent être neutres ou chargées, natives (cyclodextrines α , β , γ , δ , ϵ), branchées ou polymérisées ou encore modifiées chimiquement par exemple par substitution d'un ou plusieurs hydroxypropyles par des groupements tels que alkyles, aryles, arylalkyles, glycosidiques, ou par etherification, estérification avec des alcools ou des acides aliphatiques. Parmi les groupements ci-dessus, on préfère plus particulièrement

ceux choisis parmi les groupements hydroxypropyle, méthyle, sulfobutylether.

De façon inattendue, la présence d'un composé apte à complexer le principe actif dans l'association selon l'invention permet au principe actif, même s'il est hydrophobe, amphiphile et/ou insoluble, de pénétrer à l'intérieur de la structure polymérique résultant de l'association du ou des polymères et du ou desdits composés aptes à complexer le principe actif, et ceci avec un rendement d'encapsulation dans cette structure significativement accru par rapport à l'art antérieur, rendement qui semble lié à l'équilibre entre d'une part, la solubilisation résultant de l'utilisation de composés aptes à complexer le principe actif et, d'autre part, l'affinité du principe actif pour la nouvelle structure polymérique, ce qui constitue un progrès important sur les plans thérapeutique et industriel. Par ailleurs, les nanoparticules stabilisent également le complexe formé entre le(s)dit(s) composé(s) et le(s)dit(s) polymère(s) en raison de la nature solide des nanoparticules.

Grâce à l'invention, il est maintenant possible de charger des nanoparticules par exemple de type poly(cyanoacrylate d'alkyle) non seulement avec les principes actifs hydrophiles mais également les principes actifs hydrophobes, amphiphiles et/ou insolubles.

L'association d'un polymère et d'un composé apte à complexer le principe actif permet la création de nouveaux sites de fixation pour le principe actif qui n'apparaissent pas avec les polymères utilisés seuls. L'apparition de ces sites nouveaux, et en particulier celle d'une cavité hydrophobe avec les composés aptes à complexer les principes actifs, permet d'augmenter la charge en principe actif tout en maintenant la capacité de libération contrôlée et retardée de celui-ci qui est

inexistante lorsqu'on utilise seuls les composés aptes à complexer.

On a décrit dans l'art antérieur la
5 préparation de polymères à base de cyanoacrylate, où les
alkylcyanoacrylates sont associés au dextran au cours de
la préparation (Egea, M. A. et al., Farmaco, 1994, 49,
211-17) Or, dans cette méthode le dextran est utilisé
classiquement en tant qu'agent stabilisant et ne permet
10 pas de complexer une molécule active. En outre, le dextran
est un polysaccharide linéaire de masse moléculaire élevée
et il est donc fondamentalement différent des
cyclodextrines qui présente un faible poids moléculaire et
qui sont capables de complexer d'autres molécules. Ainsi,
15 les nanoparticules selon la présente invention présentent
des propriétés originales :

- modulation de leur taille,
- encapsulation augmentée de molécules
actives, notamment des molécules , hydrophobes,
20 amphiphiles et/ou insolubles,
- absence éventuelle de stabilisant tel que le
dextran.

Il a également été proposé dans le brevet US
No. 5 641 515 d'encapsuler l'insuline avec un polymère de
25 polycyanoacrylate. Cette encapsulation est basée sur la
formation de liaisons covalentes entre l'insuline et le
polymère ce qui est différent de la complexation à la base
des nanoparticules selon la présente invention. En effet,
les nanoparticules selon l'invention sont fondées la
30 capacité d'une molécule d'un principe actif de s'associer
avec une, ou plusieurs, molécule de cyclodextrine par la
création de liaisons chimiques de faibles énergie , donc
non covalentes, de façon à former un complexe d'inclusion.
L'existence de ce complexe résulte de la formation d'un
35 équilibre entre, d'une part, les formes libres du principe

actif et de la cyclodextrine et d'autre part, du complexe d'inclusion. Il est quantitativement caractérisé par sa constante de stabilité. Au sens de la présente invention, le terme complexation décrit exclusivement ce dernier phénomène. Ainsi, la complexation du principe actif est mise en œuvre non seulement au cours de la préparation des nanoparticules mais également dans les nanoparticules préparées, où elle représente un moyen d'associer une quantité plus importante de principe actif.

Il convient en effet de rappeler que de manière générale, l'association d'un principe actif à des nanoparticules peut résulter d'une simple dispersion du principe actif sous forme de cristaux dans le polymère constitutif des particules, d'une solubilité du principe actif dans le polymère, d'une adsorption faisant intervenir des liaisons chimiques secondaires (faibles énergies), ou enfin d'une liaison covalente (forte énergie) avec le polymère constitutif des particules.

A cet égard, il est utile d'indiquer que la préparation de nanoparticules nécessite la polymérisation des monomères de cyanoacrylate d'alkyles dispersés en phase aqueuse. La synthèse du poly(cyanoacrylate d'alkyle) permet alors la formation des nanoparticules. Généralement, cette étape est conduite en présence des principes actifs à encapsuler. Elle peut donc avoir comme conséquence, dans certains cas, le développement non souhaité de liaisons chimiques covalentes entre le principe actif et le polymère formé. Ce phénomène a été décrit pour des peptides (Grangier, J. l., J; Controlled Rel., 15, 3-13, 1991) ou d'autres molécules (vinblastine, V. Guise et al., Pharm. Res., 7, 736-741, 1990).

La présente invention permet de palier cet inconvénient, car en masquant les groupements chimiques potentiellement réactifs, la complexation du principe actif au cours de la préparation des nanoparticules de

l'invention permet de protéger ledit principe actif vis-à-vis des réactions chimiques nécessaires à la formation de la particule. Ainsi, le principe actif est avantageusement associé de manière non covalente à la particule.

5 En outre, l'association du principe actif aux nanoparticules s'effectue généralement dans un milieu aqueux acide. Or, pour certains principes actifs instables dans ces conditions, il en résulte un risque de dégradation chimique susceptible d'aboutir à
10 l'encapsulation non souhaitée de dérivés d'hydrolyse et, de plus, préjudiciable à l'obtention d'un taux d'encapsulation élevé du principe actif. En revanche, dans la présente invention, la complexation des principes actifs aux cyclodextrines permet de palier ces
15 inconconvénients car elle permet de protéger les principes actifs vis-à-vis du milieu réactionnel extérieur.

A titre de principes actifs susceptibles d'entrer dans la composition des nanoparticules de
20 l'invention, on peut citer les anticancéreux, les antisens, les antiviraux, les antibiotiques, les protéines, polypeptides, polynucléotides, nucléotides antisens, les substances vaccinales, les immunomodulateurs, les stéroïdes, les analgésiques, les
25 antimorphiniques, les antifongiques et antiparasitaires. Parmi ceux-ci, l'invention envisage tout particulièrement le taxol ou l'un de ses dérivés, la doxorubicine ou l'un de ses dérivés, les dérivés du platine.

30 Le principe actif est en général présent en une quantité de 0,01 à 300 mg/g de nanoparticules.

La proportion de composé apte à complexer le principe actif est en général de 0,1 à 70 % en poids.

La proportion de principe actif et celle du composé apte à complexer sont indépendantes l'une de l'autre.

5 L'invention concerne aussi bien entendu les compositions pharmaceutique ou de diagnostic comprenant les nanoparticules de l'invention et au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible.

10 L'invention a également pour objet la préparation des nanoparticules décrites précédemment.

Un premier procédé de préparation des nanoparticules à base d'un polymère et plus particulièrement de poly(cyanoacrylate d'alkyle) définies
15 précédemment, est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

a) préparer un complexe d'au moins un principe actif avec au moins un composé apte à le complexer, en solution dans un solvant aqueux ou non
20 aqueux,

b) ajouter progressivement au moins un monomère du polymère, et plus particulièrement le cyanoacrylate d'alkyle monomère dans la solution obtenue à l'étape (a), et

25 c) effectuer une polymérisation de préférence anionique mais également inductible par d'autres agents notamment photochimiques de ce monomère, éventuellement en présence d'un ou plusieurs agents tensio-actif et/ou stabilisant.

30 Un second procédé de préparation des nanoparticules selon l'invention, constituant une alternative au premier procédé ci-dessus, consiste à préparer d'abord des nanoparticules à base d'un polymère
35 et plus particulièrement des poly(cyanoacrylate d'alkyle)

et d'un composé apte à complexer un principe actif, désignées aussi "nanoparticules blanches" puis à associer auxdites nanoparticules blanches le principe actif. Plus particulièrement, ce procédé comprend les étapes consistant à :

a) préparer une solution d'au moins un composé apte à complexer un principe actif dans un solvant aqueux ou non aqueux,

b) ajouter progressivement au moins un monomère du polymère, et plus particulièrement le cyanoacrylate d'alkyle monomère dans la solution de l'étape (a), et

c) effectuer une polymérisation de préférence anionique mais également inductible par d'autres agents notamment photochimiques de ce monomère, éventuellement en présence d'un ou plusieurs agents tensio-actif et/ou stabilisant,

d) après un contrôle et une purification éventuelle des nanoparticules obtenus à l'étape (c), incubé lesdites particules dans une solution du principe actif dans un solvant aqueux ou non aqueux.

Comme dans le premier procédé, l'association du principe actif aux nanoparticules blanches dépendra de la quantité de cyclodextrines associée aux nanoparticules. Ce second procédé présente deux avantages :

- il permet d'éviter d'avoir à effectuer les étapes de purification sur les nanoparticules chargées en principe actif, celle-ci pouvant aboutir à des pertes de principe actif,

- il permet de réaliser un système susceptible d'être chargé extemporanément en principe actif, par exemple dans le cas où un principe actif est très instable en solution.

L'invention se rapporte donc également aux nanoparticules blanches, c'est à dire non chargées,

obtenues après les étapes (a) à (c) du second procédé décrit ci-dessus. En outre, ces particules blanches présentent un intérêt thérapeutique du fait de l'activité des cyclodextrines notamment dans le domaine du cancer (Grosse, P. Y. et al, British Journal of Cancer, 78 : 9, 1165-1169, 1998).

Aux étapes (a) et (b) du premier procédé de l'invention, le solvant est avantageusement choisi de façon à ce que, tout en maintenant des conditions favorables à la polymérisation des polymères et plus particulièrement des poly(cyanoacrylate d'alkyle), la solubilité du principe actif et du composé apte à le complexer soit maximale dans le milieu défini par ce solvant. Avantageusement un tel solvant est choisi de préférence parmi les solvants aqueux ou hydroalcooliques. Le solvant est choisi de la façon aux étapes (a), (b) et (d) du second procédé de l'invention.

La présence d'un agent tensio-actif ou d'un agent stabilisant est nécessaire pour préparer les nanoparticules de l'art antérieur. Comme le montrent les exemples qui suivent, de tels agents ne sont plus nécessaires dans le cadre de la présente invention. En effet, le composé apte à complexer le principe actif, comme les cyclodextrines, ont paradoxalement un effet stabilisant suffisant pour que l'agent tensio-actif habituellement utilisé soit absent. Ceci représente, sur le plan industriel, une économie notable. De même, on observe que le poly(cyanoacrylate d'alkyle) stabilise le complexe formé du principe actif et du composé apte à complexer le principe actif.

Cependant, si le procédé de l'invention comprend l'utilisation d'un agent stabilisant et/ou tensio-actif on préfère un dextran, ou un poloxamer.

Selon une forme de réalisation préférée de l'invention, les potentialités des cyclodextrines vis-à-vis des principes actifs permettent d'adjoindre de nouvelles propriétés aux particules. En effet, la présence des cyclodextrines dans les particules permet de stabiliser les principes actifs qui seraient instables en solution ou encore de masquer certaines caractéristiques défavorables des principes actifs telle qu'une action irritante.

Les procédés de fabrication des nanoparticules connus jusqu'à ce jour présentent des lacunes en ce qui concerne les possibilités d'ajustement de la taille des nanoparticules. Le procédé de l'invention permet de façon inattendue et remarquable d'ajuster la taille des nanoparticules directement au cours de leur fabrication sans aucune étape particulière supplémentaire.

Comme le montrent les exemples qui suivent, la taille des nanoparticules selon l'invention est essentiellement fonction de la concentration en composé apte à complexer le principe actif. Dans le cas des cyclodextrines, on peut ainsi faire varier cette taille dans une gamme très large de 300 à moins de 50 nm. L'invention permet donc, à l'aide d'essais préliminaires simples, d'ajuster la taille des nanoparticules dans les compositions, notamment pharmaceutiques, de l'invention en fonction de l'effet particulier recherché. Le choix de la taille *a priori* permet, si on le souhaite, de s'affranchir de certaines barrières physiques s'opposant à la distribution des nanoparticules dans l'organisme ou d'éviter une capture des nanoparticules de la composition par le système réticulo-endothélial. Il permet aussi un nouveau ciblage d'organes.

En conséquence à l'étape (a) du procédé de l'invention la proportion de composé apte à complexer le principe actif est en général de 0,1 à 70 % en poids par rapport audit principe actif. En effet, comme indiqué
5 précédemment, le choix de la concentration du composé apte à complexer le principe actif permet de faire varier la taille des nanoparticules obtenues par le procédé de l'invention. On obtient ainsi des nanoparticules de taille comprise entre 40 et 300 nm.

Les études relatives à la libération du composé apte à complexer le principe actif, d'une part et du principe actif, d'autre part, montrent que le profil de libération du composé apte à complexer le principe actif
15 est très rapide et que la libération est proche de 100%, tandis que la libération du principe actif comprend une première phase rapide, suivie d'une deuxième phase plus lente due à la bioérosion, classiquement décrite pour les poly(cyanoacrylates).

L'utilisation, dans les essais de libération du principe actif, d'estérases qui dégradent les nanoparticules, montre que le principe actif est contenu en grande partie au sein du réseau matriciel nanoparticulaire, ce qui est important du point de vue de
25 l'activité attendue (4).

Les différents essais effectués sur une gamme de stéroïdes, du plus hydrophile (hydrocortisone) au plus hydrophobe (progestérone) ont montré que des principes actifs très variés peuvent être contenus dans les
30 nanoparticules selon l'invention à des concentrations élevées, dépendantes de leurs caractéristiques physico-chimiques telles que notamment leur degré d'hydrophobicité.

Ainsi, la progestérone utilisée comme modèle dans les exemples qui suivent a une solubilité dans l'eau
35

très faible (0,01 mg/ml) qui, dans les processus classiques de polymérisation en émulsion dans l'eau, ne permet d'obtenir qu'une charge très faible en principe actif, dépourvue d'intérêt pratique. Ainsi, cette charge est faible lorsqu'on utilise les techniques de préparation de l'art antérieur. De façon particulièrement surprenante et intéressante, cette charge est de plus de 50 fois supérieure dans les nanoparticules selon l'invention. L'invention permet donc d'accéder à des principes actifs hydrophobes, amphiphiles et/ou insolubles et donc un renouveau de leur index thérapeutique.

L'invention a donc aussi pour objet l'utilisation des procédés décrits ci-dessus pour fabriquer un médicament à effet ciblé et à index thérapeutique amélioré.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront de la description des exemples qui suivent faisant références aux dessins annexés dans lesquels :

La Figure 1 représente les variations de la taille des particules ou granulométrie et du potentiel zéta (moyenne de trois essais \pm SEM) de nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) (PIBCA) préparées en présence de 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD), en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 2 représente les variations de la granulométrie et du potentiel zéta (moyenne de trois essais \pm SEM) de nanoparticules de PIBCA préparées en présence du complexe progestérone : 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD), en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 3 représente les variations de la teneur en HP β CD (moyenne de trois essais \pm SEM) de

nanoparticules de PIBCA préparées en présence de HP β CD, en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 4 représente les variations de la teneur en HP β CD (moyenne de trois essais \pm SEM) de nanoparticules de PIBCA préparées en présence du complexe progestérone : HP β CD, en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 5 représente les variations de la teneur en progestérone (moyenne de trois essais \pm SEM) de nanoparticules de PIBCA/HP β CD, en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 6 montre l'influence de la taille des particules sur la vitesse de libération de la progestérone dans du tampon au borate alcalin (ABB) (pH 8,4), à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

La Figure 7 montre l'influence de la constitution du milieu de libération sur la vitesse de libération de la progestérone dans du milieu ABB (pH 8,4), à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

A : ABB:PEG 400 (80:20)

B : ABB:PEG 400 (60:40)

La Figure 8 montre l'influence de la présence d'enzymes de type estérase sur la vitesse de libération de la progestérone dans du milieu ABB (pH 8,4), à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

A : milieu de libération avec de l'estérase 25 UI

B : milieu de libération avec de l'estérase 100 UI

La Figure 9 montre la vitesse de libération de la HP β CD dans du milieu ABB à 37°C.

La Figure 10 montre les courbes de calorimétrie par analyse différentielle (DSC) obtenues à une vitesse d'accroissement de la température de 10°C/min.

Dans les exemples qui suivent, le cyanoacrylate d'isobutyle, l'hydrocortisone, la prednisolone et le danazol la progestérone et les estérases (19 UI/ml) ont été obtenus auprès de Sigma Chemicals (St. Louis, Mo, EUA), la spironolactone, la testostérone, l'acétate de mégestrol ont été obtenue respectivement auprès de Sophartex, Besin-Iscovesco et Upjohn, les α -, β - et γ -cyclodextrines, les 2-hydroxypropyl- α -, 2-hydroxypropyl- β - et 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrines, dont les valeurs de MS moyennes sont respectivement de 0,9, 0,6 et 0,6, ont été obtenues auprès de Wacker Chemie GmbH (Munich, Allemagne) et l'éther de sulfobutyle et de β -cyclodextrine (ci-après SBE β CD) a été obtenu auprès de CyDex L. C. (Overland Park, Kansas, EUA). Le poloxamer 188 (Lutrol F68[®]) est un don de BASF (Ludwigshafen, Allemagne). Les autres produits chimiques et les solvants sont de qualité analytique et HPLC.

EXEMPLE 1 : Préparation de nanoparticules en présence de différentes cyclodextrines et de poloxamer.

Les nanoparticules sont préparées par polymérisation anionique (2) de 100 μ l de cyanoacrylate d'isobutyle dans 10 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M (pH 2,0) contenant 1% p/v de poloxamer 188 et en présence de 5 mg/ml de α -, β -, γ -, 2-hydroxypropyl- α -, 2-hydroxypropyl- β - ou 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrine ou de sulfobutyle éther de β -cyclodextrine. La solution de cyclodextrine est agitée au moyen d'un agitateur magnétique (1000 tr/min) à la température ambiante et le monomère est ajouté goutte à goutte. Après agitation pendant 6 heures, la suspension est filtrée au moyen d'un préfiltre de 2,0 μ m (Millex AP 500[®]) puis encore caractérisée.

EXEMPLE 2 : Préparation de nanoparticules en présence de différentes cyclodextrines.

Les nanoparticules sont préparées par polymérisation anionique (2) de 100 µl de cyanoacrylate d'isobutyle dans 10 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M (pH 2,0) et en présence de 5 mg/ml de α-, β-, γ-, 2-hydroxypropyl-α-, 2-hydroxypropyl-β- ou 2-hydroxypropyl-γ-cyclodextrine ou de sulfobutyle éther de β-cyclodextrine. La solution de cyclodextrine est agitée au moyen d'un agitateur magnétique (1000 tr/min) à la température ambiante et le monomère est ajouté goutte à goutte. Après agitation pendant 6 heures, la suspension est filtrée au moyen d'un préfiltre de 2,0 µm (Millex AP 500®) puis encore caractérisée.

EXEMPLE 3 : Préparation de complexes progestérone / hydroxypropyl-β-cyclodextrines (HPβCD).

Les complexes progestérone/HPβCD sont préparés en mélangeant 3,615 g de HPβCD avec 3,0 g de progestérone dans 150 ml d'eau sous agitation au moyen d'un agitateur magnétique pendant 24 heures à la température ambiante. Après cela, le mélange est filtré (0,45 µm). La HPβCD et la progestérone sont dosées dans la solution filtrée avant d'être utilisées pour la préparation de nanoparticules chargées de progestérone.

EXEMPLE 4 : Préparation de nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle)/HPβCD (PIBCA/ HPβCD) chargées de progestérone.

La solution du complexe progestérone/HPβCD obtenu comme décrit dans l'exemple 3 est diluée pour obtenir des concentrations de 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0 et 20,0 mg/ml de HPβCD dans le milieu de polymérisation. Les nanoparticules sont préparées comme dans l'exemple 1, en absence ou en présence de 1% (p/v) de poloxamer 188.

EXEMPLE 5 (témoin) : Préparation de nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) chargées de progestérone et dépourvues de HP β CD.

5 Des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) sont préparées en l'absence de cyclodextrine dans le milieu de polymérisation, pour servir de témoin. Les nanoparticules chargées de progestérone sont préparées en dissolvant le principe actif dans de l'acide chlorhydrique dilué (pH 2,0) en présence de 1% (p/v) de poloxamer 188 (environ 60 μ g/ml, correspondant à la solubilité maximale dans ce milieu). Le processus de polymérisation est mis en oeuvre comme décrit à l'exemple 1.

15 EXEMPLE 6 : Dosage de la progestérone et de la HP β CD dans les nanoparticules obtenues.

20 Les différentes suspensions de nanoparticules sont centrifugées à 82 000 g pendant 30 à 40 min à 25°C (Beckman, L5-65 Ultracentrifuge, rotor de type 70,1 Ti) et remises en suspension dans 5 ml d'eau distillée. Les suspensions sont finalement lyophilisées (Christ HED Freeze Drier, Allemagne).

25 Pour doser la charge de progestérone dans les nanoparticules, les produits lyophilisés sont dilués dans de l'acétonitrile de qualité HPLC et les solutions sont analysées par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Le système de HPLC consiste en une unité de délivrance de solvant 510 de Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France), un préleveur automatique d'échantillons WISP 712, une colonne (250 x 4,6 mm) Nova-Pak C18 4 μ m, un détecteur d'absorbance 486 qui fonctionne à 245 nm et est en interface avec un module de données 746. Le débit est de 1,0 ml/min et la phase mobile est constituée d'eau et d'acétonitrile (40:60) où la durée de rétention est

d'environ 12 min. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne de trois dosages.

Pour quantifier la HP β CD, les nanoparticules lyophilisées sont hydrolysées au moyen de NaOH 0,2 M pendant 12 heures, le pH est ajusté à 7,0 ($\pm 0,5$) et la HP β CD est quantifiée par dosage spectrophotométrique de la décoloration de solutions de phénolphthaléine en présence de HP β CD. En effet, la phénolphthaléine forme des complexes d'inclusion stables et incolores avec les cyclodextrines (CD) (5). Par conséquent, l'intensité de la couleur d'une solution de phénolphthaléine dans du tampon au borate alcalin décroît proportionnellement à la quantité de CD en solution.

Des solutions de référence sont préparées en diluant des solutions-mères de CD dans de la solution tampon de borate alcalin à pH 10,0 contenant 2% d'une solution éthanolique de phénolphthaléine 0,006 M. Les courbes de référence ($\lambda = 550$ nm) sont linéaires pour les concentrations en CD allant de 1 à 100 μ g/ml. Les échantillons sont additionnés de 4 parties de solution tampon contenant de la phénolphthaléine et testées directement.

EXEMPLE 7 : Caractérisation des nanoparticules.

La distribution granulométrique, la taille moyenne et la polydispersité des nanoparticules sont estimées par diffusion de la lumière laser en utilisant un NS Coulter Nanosizer (Coultronics, Margency, France). Les échantillons sont dispersés dans de l'eau MilliQ (résistivité > 18 M Ω , Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Chaque analyse dure 200 s. La température est de 20°C et l'angle d'analyse est de 90°. Le potentiel zéta des particules en suspension dans l'eau

MilliQ est déterminé par vélocimétrie Doppler au laser (Zetasizer 4, Malvern, Angleterre).

RÉSULTATS DES EXEMPLES 1 À 7.

5 Les caractéristiques des particules préparées en présence de 5 mg/ml de différentes cyclodextrines et 1% de poloxamer 188 (moyenne de 3 préparations répétées \pm SEM) sont rassemblés dans le tableau I ci-dessous.

10

Tableau I

CD (5 mg/ml)	Taille (nm) \pm S.D.	Potentiel ζ (mV) \pm S.D.	Teneur en CD (μ g de CD/mg de nanoparticules)
alpha	228 \pm 69	-34,4 \pm 4,0	ND
béta	369 \pm 7	-24,7 \pm 8,2	360
gamma	286 \pm 9	-22,9 \pm 0,6	240
HPalpha	244 \pm 25	-27,0 \pm 2,2	ND
HPbéta	103 \pm 6	-8,6 \pm 0,9	247
HPgamma	87 \pm 3	-2,6 \pm 2,2	220
SBEbéta	319 \pm 10	-45,4 \pm 2,4	ND

CD = cyclodextrine

HP = hydroxypropyl

SBE = éther de sulfobutyle

15 La taille des particules, le potentiel zéta, la teneur en cyclodextrine et la stabilité (valeurs non représentées) sont influencés par la nature de la cyclodextrine.

20 La quantité des différentes cyclodextrines liées aux particules est dans la gamme de 20 à 35% (p/p) du poids total des particules.

25 Les nanoparticules formulées avec la HP β CD sont les plus intéressantes car elles présentent une granulométrie moyenne inférieure à 100 nm et un potentiel zéta voisin de zéro mV. En outre, l'HP β CD présente une très grande solubilité dans le milieu de polymérisation et

une excellente tolérabilité. Elle permet par ailleurs l'encapsulation de nombreuses substances. Par conséquent, les études complémentaires ont été effectuées avec la HP β CD.

5 En présence de HP β CD dans le milieu de polymérisation, l'addition de l'agent tensio-actif poloxamer 188 n'est pas essentielle pour la production de nanoparticules.

10 D'une part, comme le montre la Figure 1, la taille et le potentiel zéta des particules ne sont pas modifiés par la présence de poloxamer 188.

15 D'autre part, la concentration de HP β CD influence considérablement la taille et le potentiel zéta. Une augmentation de la concentration de HP β CD de 0 à 12,5 mg/ml conduit à une diminution de la taille des particules de 300 nm à moins de 50 nm. De même, le potentiel zéta des particules décroît progressivement de valeurs fortement négatives (-40 mV) à un potentiel de surface proche de 0 mV. Ces tendances sont généralement maintenues lorsque les nanoparticules sont préparées en présence de progestérone, comme le montre la Figure 2. Par rapport aux particules dépourvues de progestérone, le potentiel zéta est légèrement négatif dans la gamme de concentration de HP β CD à l'étude. De plus, en l'absence de poloxamer 188, on observe une augmentation rapide de la taille des nanoparticules jusqu'à 450 nm, suivie d'une diminution rapide lorsque la concentration de HP β CD est supérieure à 10 mg/ml. Ce phénomène est supprimé en présence de poloxamer 188. L'addition de HP β CD dans le milieu de polymérisation conduit à l'association de grandes quantités de HP β CD aux nanoparticules, comme le montre la Figure 3. La quantité de HP β CD associée aux particules augmente continuellement et peut atteindre 60% du poids des particules. Lorsque les masses initiales de HP β CD et de cyanoacrylate d'isobutyle dans le milieu de

20

25

30

35

polymérisation sont égales, la quantité de HP β CD associée aux particules est d'environ 35%. De plus, l'association de HP β CD aux particules n'est pas influencée par la présence de poloxamer 188. La teneur en HP β CD des nanoparticules n'est pas considérablement affectée par la présence de progestérone dans le milieu de polymérisation, comme le montre la Figure 4. La charge de progestérone des particules augmente de façon spectaculaire lorsque les particules sont préparées en présence de HP β CD. La charge de progestérone, en l'absence de HP β CD est de 0,79 μ g/mg de particules et elle augmente progressivement jusqu'à être multipliée par 50, ce qui correspond à 45 μ g/mg de particules, comme le montre la Figure 5. Il n'y a pas de différences significatives entre les particules préparées avec ou sans poloxamer 188.

Les caractéristiques des nanoparticules utilisées dans les exemples 8 à 10 qui suivent sont décrites dans le tableau II ci-dessous.

20

Tableau II

Formulation ^a	Taille (nm) \pm SD	Teneur en HP β CD ^b	Teneur en principe actif ^c
2,5	158 \pm 22	64 \pm 5,4	10,9 \pm 3,3
10,0	70 \pm 5	240 \pm 7,6	23,9 \pm 4,4

a = concentration initiale en HP β CD dans le milieu de polymérisation (mg/ml)

b = μ g de HP β CD par mg de nanoparticules

25

c = μ g de progestérone par mg de nanoparticules

EXEMPLE 8 : Libération de la progestérone *in vitro* à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

30

Une quantité pesée de nanoparticules lyophilisées (contenant 1% (p/v) de glucose) est mise dans un flacon contenant 15 ml d'une solution tampon au borate alcalin (ABB) (pH 8,4) ou d'ABB contenant des estérases

(25 et 100 UI) ou d'ABB/poly(éthylèneglycol) 400 (PEG) à 20 et 40% (v/v). Les échantillons sont agités au moyen d'un agitateur magnétique à 200 tr/min et 37°C, et prélevés à des intervalles prédéterminés. Les suspensions sont centrifugées à 82 000 g pendant 30 minutes à 20°C puis la teneur en progestérone du surnageant est dosée pour tous les milieux et la teneur en HP β CD pour les milieux au PEG. La teneur en progestérone est dosée par HPLC comme décrit plus haut, avec injection de 100 μ l pour les échantillons incubés dans des milieux à l'ABB et 20 μ l pour les milieux au PEG.

Tous les essais sont réalisés dans des conditions telles que la concentration en principe actif dans la phase de libération soit maintenue au-dessous de 10% de saturation.

EXEMPLE 9 : Libération de la HP β CD *in vitro* à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

L'étude de la libération de la HP β CD est effectuée comme celle de la progestérone dans du milieu ABB avec quantification de la teneur en CD après ultracentrifugation, par complexation avec de la phénolphtaléine comme décrit plus haut. La concentration de CD à 100% de libération est d'environ 100 μ g/ml.

EXEMPLE 10 : Calorimétrie par analyse différentielle (DSC).

Les études de DSC sont effectuées en utilisant un calorimètre d'analyse différentielle Perkin Elmer DSC-7. La température est calibrée en utilisant le point de transition de fusion de l'indium. Des échantillons pesant environ 4 mg sont placés dans des capsules d'aluminium et chauffés de 0 à 250°C à une vitesse d'exploration de 10°C/min.

RÉSULTATS DES EXEMPLES 8 À 10.

La Figure 6 des dessins annexés représente le profil de libération de la progestérone à partir de nanoparticules combinées de PIBCA/HP β CD dans l'ABB (pH 8,4). Sur ce graphique on peut observer une courbe de libération biphasique avec une libération initiale rapide (effet d'éclatement) dans la première heure pour les deux formulations testées (environ 10 et 34% des nanoparticules de 150 et 70 nm, respectivement). Cette libération rapide pourrait être attribuée à la fraction de progestérone qui est adsorbée ou faiblement liée à la grande surface générée par la formation de nanoparticules plutôt qu'au complexe progestérone/CD incorporé dans le réseau polymère. La seconde phase correspond à une libération exponentielle plus lente avec environ 35 et 62% de progestérone libérée à partir de nanoparticules de 150 et 70 nm, respectivement. La phase de libération ralentie peut être le résultat d'une simple diffusion vers l'extérieur de la progestérone à partir des nanoparticules ou de la pénétration de la solution de libération dans les nanoparticules avec dissolution de la progestérone, suivie de sa diffusion à l'extérieur.

Les études *in vitro* démontrent que différents facteurs peuvent affecter la libération de principes actifs à partir de systèmes colloïdaux. Ces facteurs comprennent la taille et la morphologie des particules, la charge en principe actif et la solubilité de celui-ci (6, 7, 8). Conformément à ce qui a été observé dans les travaux antérieurs, les nanoparticules les plus petites (70 nm) avec une charge supérieure en principe actif (24 μ g/mg) présentent une libération plus rapide que les particules plus grandes (170 nm) avec une charge plus faible en progestérone (10,5 μ g/mg). La taille moyenne et la charge de principe actif des nanoparticules représentent les facteurs majeurs de la vitesse de

libération, avec une réduction de la phase rapide pour les nanoparticules plus grandes.

La Figure 7 montre les profils de libération de la progestérone à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD en présence de PEG 400 (20 et 40%) en tant qu'agent solubilisant. L'utilisation de ce type de milieu permet de réduire le volume de milieu de libération et par conséquent la concentration en principe actif permettant une meilleure détection (9). Dans un cas comme celui-ci où des solvants ou des agents solubilisants non aqueux sont employés, on peut obtenir des informations concernant le mécanisme de libération. Comme montré à la Figure 7, le profil de libération n'est pas identique pour les deux milieux, ce qui signifie que la libération est fortement influencée par la concentration en PEG. Par conséquent, la libération de la progestérone doit être déterminée par la pénétration du solvant dans la matrice polymère, avec dissolution et diffusion à l'extérieur du principe actif à partir des nanoparticules. Au contraire, quand la libération du principe actif résulte de la simple diffusion à travers une matrice polymère, la composition du solvant de libération ne peut pas influencer la libération de principe actif (10).

Le procédé de préparation de nanoparticules qui consiste à ajouter le monomère à une solution aqueuse d'agent tensio-actif et à agiter pour obtenir des micelles (2), peut déterminer la distribution du principe actif dans les micelles pendant l'étape de polymérisation.

La libération rapide observée dans les figures 6 et 7 suggère que la surface des particules a été enrichie en progestérone au cours de l'étape de polymérisation. Par ailleurs, une forte proportion du principe actif a pu être piégée dans le réseau de polymère qui pouvait avoir une structure interne hautement poreuse

(11). Ce fait pourrait expliquer l'augmentation de la vitesse de libération lorsque la concentration en PEG augmente (Figure 7), le PEG pénétrant dans la structure à des vitesses différentes selon la constitution du milieu de libération puis modifiant la diffusion du principe actif vers l'extérieur.

Malgré une augmentation très importante de la vitesse de libération obtenue grâce à l'addition de PEG dans le milieu de libération, la libération de la progestérone n'atteint pas 100% (elle est d'environ 75 et 82%, respectivement avec 40% de PEG).

Au contraire, la présence d'enzymes de type estérase dans le milieu de libération conduit à une libération plus rapide que dans une solution de libération dépourvue d'estérase et la quantité de progestérone libérée est très proche de 100% pour les deux formulations testées et pour les deux concentrations d'enzyme (Figure 8). Ces faits peuvent suggérer que les molécules de progestérone sont, au moins en partie, piégée à l'état moléculaire dans la matrice polymère de la nanoparticule de l'invention et/ou liées au réseau de cyanoacrylate d'isobutyle (12). L'utilisation d'enzymes de type estérase dans le milieu de libération conduit à une dégradation ou une dissolution des chaînes polymères des nanoparticules de poly(cyanoacrylate). Dans ce cas, les principes actifs immobilisés dans la matrice sont alors libérés par la dégradation progressive de celle-ci.

La bioérosion provoquée par l'hydrolyse de la liaison ester des chaînes latérales du PIBCA est le mécanisme qui permet une accélération significative de la libération de progestérone, ce qui correspond aux résultats rapportés par d'autres auteurs (12, 13). Parfois, les études de libération de principes actifs effectuées dans des milieux contenant des estérases ne conduisent pas à une libération de 100% du principe actif

incorporé (12, 14, 15). Il est suggéré qu'alors il existe la possibilité d'une liaison entre les chaînes de PIBCA et les molécules de principe actif (12, 14). Les profils de libération de la cyclodextrine à partir des nanoparticules représentés à la Figure 9 montrent une libération très rapide et très proche de 100% dans la première heure, ce qui montre que ces molécules ne sont pas liées de manière chimique au polymère mais vraisemblablement simplement adsorbées ou piégées dans le polymère.

Les profils de DSC des échantillons contenant de la HP β CD montrent une transition endothermique large, reproductible dans la gamme de 30 à 90°C avec des températures de début comprises dans cette gamme (Figure 10 a, c et d). Ce pic asymétrique a été attribué à l'élimination d'eau. Les échantillons contenant de la progestérone (mélange physique et progestérone seule) présentent un pic endothermique prononcé à environ 130°C, ce qui correspond à la température de transition de fusion de la progestérone sous forme cristalline (Figure 10 b et c). Le complexe HP β CD : progestérone ne présente que la transition endothermique dans la gamme de 30 à 90°C décrite ci-dessus, avec disparition de la transition de fusion de la forme cristalline de la progestérone (Figure 10 d), ce qui suggère que le principe actif est dispersé à l'état moléculaire dans la cavité des molécules de cyclodextrine. Sous la même forme, des échantillons de nanoparticules de PIBCA/HP β CD chargées de progestérone ne présentent pas de pic endothermique prononcé qui, dans ce cas, est remplacé par une transition endothermique large dans la gamme de 130 à 170°C (Figure 10 e et f). Ce phénomène suggère que la progestérone se trouve à l'état moléculaire soit dissoute dans le polymère soit incluse dans les cyclodextrines associées au nanoparticules selon l'invention. Sous cette forme, l'ensemble des résultats concernant la libération de la cyclodextrine et de la

progesterone dans les différents milieux et les courbes de DSC, ajoutés aux données de la littérature, indiquent que la morphologie des nanoparticules pourrait être représentée par un noyau polymère contenant une fraction du principe actif à l'état moléculaire, avec une surface enrichie par des complexes cyclodextrine:progesterone. Cette structure pourrait expliquer la libération biphasique de la progesterone avec une première phase rapide due peut-être à la désorption du complexe cyclodextrine:progesterone à partir de la surface, et une seconde phase très lente comprenant la diffusion de la progesterone vers l'extérieur, à travers le réseau polymère.

EXEMPLE 11 : Préparation de nanoparticules de poly (cyanoacrylate d'isobutyle)/HP β CD chargées en divers principes actifs.

Des complexes de prednisolone, de spironolactone, de testotérone, de progesterone, de danazol et d'acetate de megestrol ont été obtenues en mélangeant 300 mg HP β CD avec 15 mg de stéroïdes dans 15 ml d'eau à 37°C pendant 72 heures sous agitation magnétique. Les suspensions ont été filtrées (0.45 mm) et les concentrations en cyclodextrine et en principe actif ont été dosées selon l'exemple 12 ci-après. Des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle)/HP β CD sont préparées comme dans l'exemple 1 en ajoutant une solution des complexes formés contenant 10mg/ml de HP β CD dans une solution de poloxamer à 1% p/V.

EXEMPLE 12 (témoin) : Préparation de nanoparticules de poly (cyanoacrylate d'isobutyle) chargées en divers principes actifs.

Des solutions d'hydrocortisone, de prednisolone, de spironolactone, de testotérone, de

progesterone, de danazol et d'acetate de megestrol à des concentrations correspondant à la concentration à saturation dans du poloxamer 188 (1% p/v) ont été ajoutées séparément dans les milieux de polymérisation. Des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) chargées en divers principes actifs ont alors été préparées selon l'exemple 1, mais en l'absence de HP β CD.

EXEMPLE 13 : Dosage de l'hydrocortisone, de la prednisolone, de la spironolactone, de la testoterone, de la progesterone, du danazol, de l'acetate de megestrol et de HP β CD.

Les différents stéroïdes ont été dosés selon l'exemple 6 qui permet le dosage de ces différentes substances dans les mêmes conditions analytiques.

L'HP β CD a été dosée également selon l'exemple 6.

EXEMPLE 14 : Caractéristiques de taille et de potentiel zéta des nanoparticules préparées selon l'invention en présence ou en absence de poloxamer 188

Les nanoparticules préparées selon l'exemple 11 et l'exemple 12 ont été caractérisées selon l'exemple 7. La taille des particules chargées en stéroïdes était généralement diminuée et était proche de 100 nm environ lorsque les nanoparticules selon l'invention étaient préparées en l'absence de poloxamer 188 et seulement en présence de l'HP β CD suggérant un masquage des charges par les molécules de cyclodextrine localisées à la surface des particules.

Le tableau III ci-dessous rapporte le chargement de la drogue par des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'alkyle) ou des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'alkyle) et hydroxypropyl- β -cyclodextrine et le contenu en cyclodextrine correspondant (moyenne de 3 valeurs).

Tableau III

Échantillon		CD (mg/g)	chargement de la drogue (mg/g)
PIBCA			
PIBCA	hydrocortisone (HD)	-	2,19
	PE	-	0,12
	sprironolactone (SP)	-	7,65
	testosterone (TE)	-	2,27
	megestrol acetate (AM)	-	0,25
	danazol (DA)	-	0,34
	progesterone (PO)	-	0,79
PIBCA/HP β CD	HD	180	15,3
	PE	210	15,5
	SP	230	53,0
	TE	180	19,5
	AM	220	1,4
	DA	280	11,2
	PO		24,0

10

RÉSULTATS DES EXEMPLES 11 À 14 : Augmentation de la charge en stéroïdes de nanoparticules selon l'invention.

15

Les valeurs des chargements en stéroïdes exprimés en valeur absolues pour les nanoparticules selon l'invention ou les particules témoins sont rassemblées dans le tableau IV (moyenne de trois préparations). Le calcul des valeurs d'accroissement de la charge des particules montre que l'augmentation de la charge peut atteindre 129 fois, dans le cas de la prednisolone.

20

Tableau IV

Stéroïdes	Chargement des nanoparticules de PIBCA sans HP β CD (mmole/g)	Chargement des nanoparticules combinées de PIBCA et HP β CD (mmole / g)	Augmentation du chargement (nombre de fois)
Hydrocortisone	6,04	42,21	7,0
Prednisolone	0,33	43,00	129,2
Spirolactone	18,36	127,23	6,9
Testoteron	7,87	67,6	8,6
Acétate de megestrol	0,65	3,64	5,6
Danazol	1,01	33,19	32,9
Progesterone	2,51	69,60	27,7

RÉFÉRENCES

- 1) J. Kreuter, Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Decker, New York, 1994, 219-342.
- 5 2) Brevets EP-B-0 007 895 (US-A-4,329,332 & US-A-4,489,055) et EP-B-0 064 967 (US-A-4,913,908).
- 3) C. Cuvier et coll., Biochem. Pharmacol., 44, 509-517 (1992).
- 4) AC de Verdière et coll., British Journal
10 of Cancer 76(2), 198-205 (1997).
- 5) M. Vikmon, Proceed. First International Symposium on Cyclodextrins, Budapest, 1981, 69-74.
- 6) E. Allémann et coll., Pharm. Res., 10, 1732-1737 (1993).
- 15 7) J.-C. Leroux et coll., J. Control. Rel., 39, 339-350 (1996).
- 8) N. Erden et coll., International Journal of Pharmaceutics, 137, 57-66 (1996).
- 9) J.-P. Benoit et coll., Microspheres and Drug
20 Therapy. Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects, Elsevier, Amsterdam, 1984, 91-102.
- 10) C. Washington, Int. J. Pharm., 58, 1-12 (1990).
- 11) P. Couvreur et coll., J. Pharm. Sci., 68,
25 1521-1524 (1979).
- 12) F. Fawaz et coll., International Journal of Pharmaceutics, 154, 191-203 (1997).
- 13) J. L. Grangier et coll., J. Control. Rel., 15, 3-13 (1991).
- 30 14) Ch. Tasset et coll., J. Control. Rel., 33, 23-30 (1995).
- 15) B. Seijo et coll., Int. J. Pharm., 62, 1-7 (1990).

REVENDEICATIONS

5 1) Nanoparticules contenant au moins un principe actif, caractérisées en ce qu'elles comprennent l'association d'au moins un polymère et d'au moins un composé apte à complexer ledit principe actif.

10 2) Nanoparticules selon la revendication 1, caractérisées en ce que l'un au moins des polymères est un poly(cyanoacrylate d'alkyle) dans lequel le groupe alkyle, linéaire ou ramifié, comprend de 1 à 12 atomes de carbone.

15 3) Nanoparticules selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisées en ce que le composé apte à complexer le principe actif est un oligosaccharide cyclique.

20 4) Nanoparticules selon la revendication 3, caractérisées en ce que le composé apte à complexer le principe actif est une cyclodextrine neutre ou chargée, native, branchée ou polymérisée ou modifiées chimiquement.

25 5) Nanoparticules selon la revendication 4, caractérisées en ce que le composé apte à complexer le principe actif est une cyclodextrine modifiée chimiquement par substitution d'un ou plusieurs hydroxypropyles par des groupements alkyle, aryle, arylalkyle, glycosidique, ou par etherification, estérification avec des alcools ou des acides aliphatiques.

30 6) Nanoparticules selon l'une quelconques des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles présentent une taille comprise entre 300 et moins de 50 nm.

35

7) Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le principe actif est hydrophile, hydrophobe, amphiphile et/ou insoluble.

5

8) Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le principe actif est choisi parmi les anticancéreux, les molécules antisens, les antiviraux, les antibiotiques, les protéines, polypeptides, polynucléotides, les substances vaccinales, les immunomodulateurs, les stéroïdes, les analgésiques, les antimorphiniques, les antifongiques et antiparasitaires.

10

15

9) Nanoparticules selon la revendication 8, caractérisées en ce que le principe actif est le taxol ou l'un de ses dérivés.

20

10) Nanoparticules selon la revendication 8, caractérisées en ce que le principe actif est la doxorubicine ou l'un de ses dérivés.

25

11) Nanoparticules selon la revendication 8, caractérisées en ce que le principe actif est un dérivé du platine.

30

12) Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le principe actif est présent en une quantité de 0,01 à 300 mg/g de nanoparticules.

35

13) Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que la proportion de composé apte à complexer le principe actif est de 0,1 à 70 % en poids.

14) Procédé de préparation de nanoparticules à base d'un polymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

a) préparer un complexe d'au moins un principe actif avec au moins un composé apte à le complexer, en solution dans un solvant aqueux ou non aqueux,

b) ajouter progressivement au moins un monomère du polymère dans la solution obtenue à l'étape (a), et

c) effectuer une polymérisation, par exemple anionique ou inductible par d'autres agents notamment photochimiques, de ce monomère éventuellement en présence d'un ou plusieurs agents tensio-actif et/ou stabilisant.

15) Procédé de préparation de nanoparticules à base d'un polymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- préparer des nanoparticules à base d'un polymère et plus particulièrement des poly(cyanoacrylate d'alkyle) et d'un composé apte à complexer un principe actif,

- associer auxdites nanoparticules le principe actif.

16) Procédé de préparation de nanoparticules à base d'un polymère selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

a) préparer une solution d'au moins un composé apte à complexer un principe actif dans un solvant aqueux ou non aqueux,

b) ajouter progressivement au moins un monomère du polymère, et plus particulièrement le

cyanoacrylate d'alkyle monomère dans la solution de l'étape (a), et

5 c) effectuer une polymérisation de préférence anionique mais également inductible par d'autres agents notamment photochimiques de ce monomère, éventuellement en présence d'un ou plusieurs agents tensio-actif et/ou stabilisant,

10 d) après un contrôle et une purification éventuelle des nanoparticules obtenus à l'étape (c), incuber lesdites particules dans une solution du principe actif dans un solvant aqueux^{ss} ou non aqueux.

15 17) Procédé de préparation de nanoparticules à base de poly(cyanoacrylate d'alkyle) selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisé en ce qu'à l'étape (b) on ajoute progressivement au moins un cyanoacrylate d'alkyle monomère.

20 18) Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que aux étapes (a), (b) et (d), le solvant est avantageusement choisi de façon à ce que, tout en maintenant des conditions favorables à la polymérisation des polymères et plus particulièrement des poly(cyanoacrylate d'alkyle), la solubilité du principe actif et du composé apte à le complexer soit maximale dans le milieu défini par ce solvant.

30 19) Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisé en ce que l'étape (c) est effectuée sans agent tensio-actif et/ou stabilisant.

35 20) Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisé en ce que dans l'étape (a) la proportion de composé apte à complexer le principe

actif est en général de 0,1 à 70 % en poids par rapport audit principe actif.

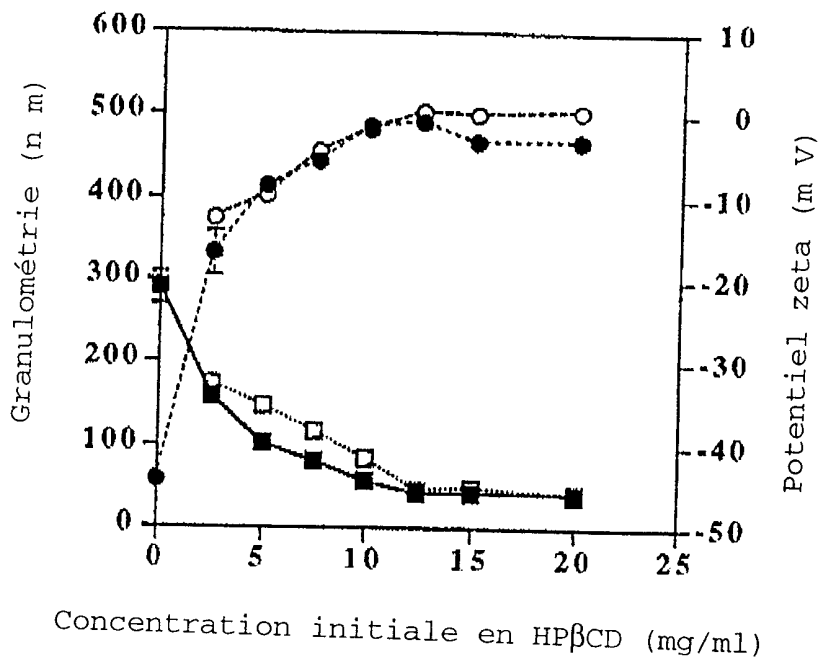
5 21) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 20 pour fabriquer un médicament à effet ciblé et à index thérapeutique amélioré.

10 22) Nanoparticule comprenant l'association d'un polymère et plus particulièrement des poly(cyanoacrylate d'alkyl^{es}) et d'un composé apte à complexer un principe actif, susceptible d'être obtenu par les étapes (a) à (c) d'un procédé selon la revendication 16.

15 23) Nanoparticules selon la revendication 22, caractérisées en ce que le composé apte à complexer un principe actif est une cyclodextrine neutre ou chargée, native, branchée ou polymérisée ou modifiées chimiquement.

20

Fig. 1

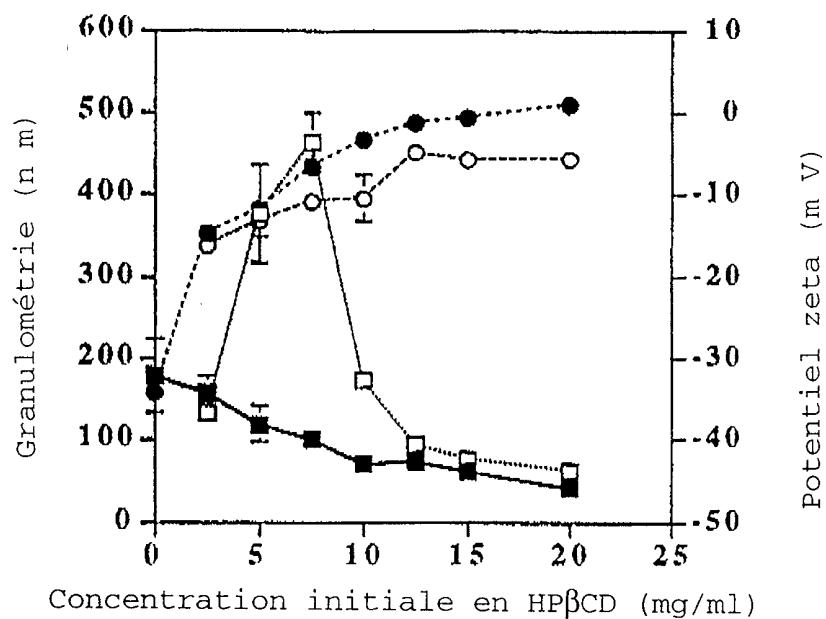


TAILLE DES PARTICULES ET POTENTIEL ZETA DE NANOPARTICULES PRÉPARÉES EN PRÉSENCE DE HPβCD

- Granulométrie des nanoparticules avec 1 % de Poloxamer 188
- Granulométrie des nanoparticules sans Poloxamer 188
- Potentiel zeta des nanoparticules avec 1 % de Poloxamer 188
- Potentiel zeta des nanoparticules sans Poloxamer 188.

2/10

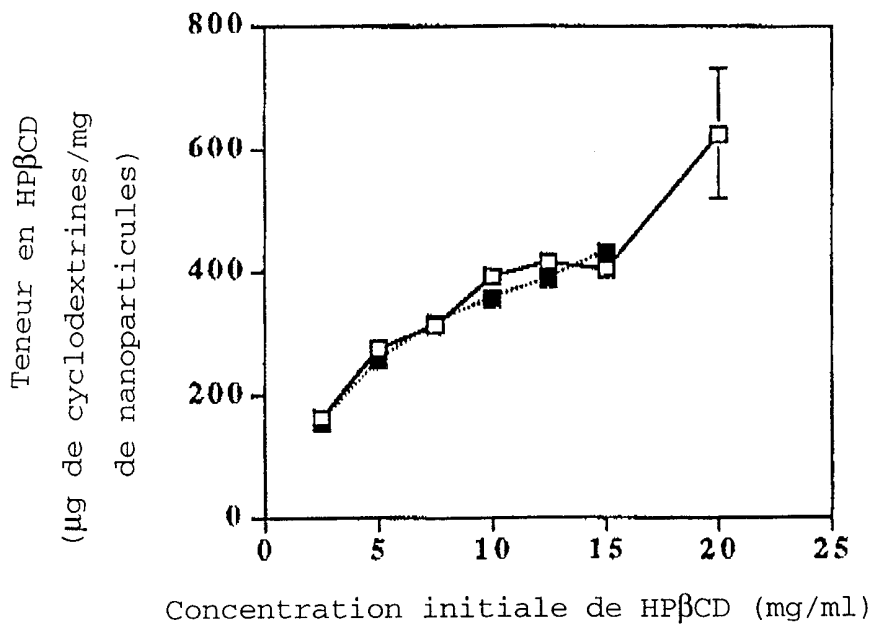
Fig. 2



NANOPARTICULES DE PIBCA / HP β CD PRÉPARÉES EN PRÉSENCE DU COMPLEXE PROGESTERONE / HP β CD

- Granulométrie des nanoparticules avec 1 % de Poloxamer 188
- Granulométrie des nanoparticules sans Poloxamer 188
- Potentiel zeta des nanoparticules avec 1 % de Poloxamer 188
- Potentiel zeta des nanoparticules sans Poloxamer 188.

Fig. 3



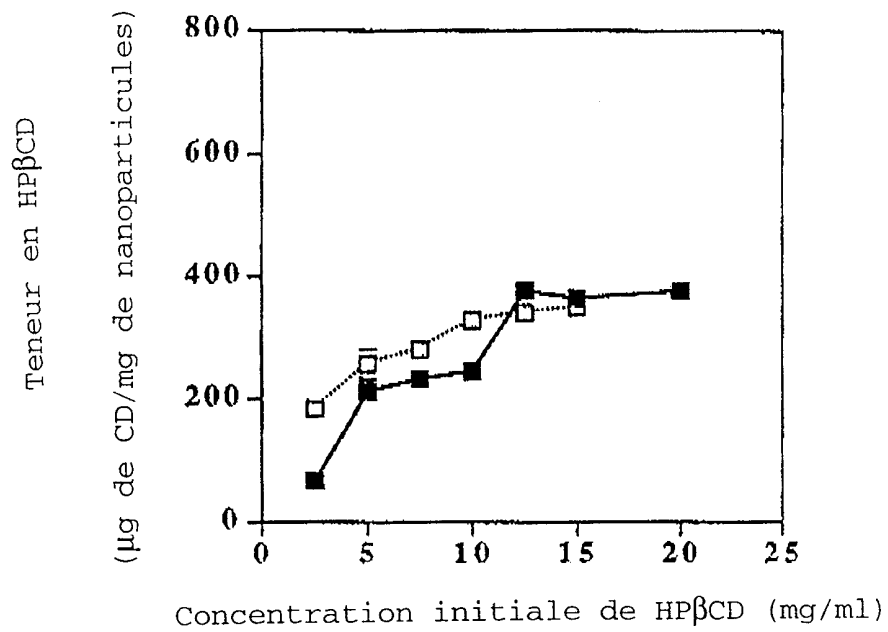
TENEUR EN HPβCD DANS DES NANOPARTICULES LIBRES (NON CHARGÉES)

■ avec 1 % de Poloxamer 188

□ sans Poloxamer 188

4/10

Fig. 4

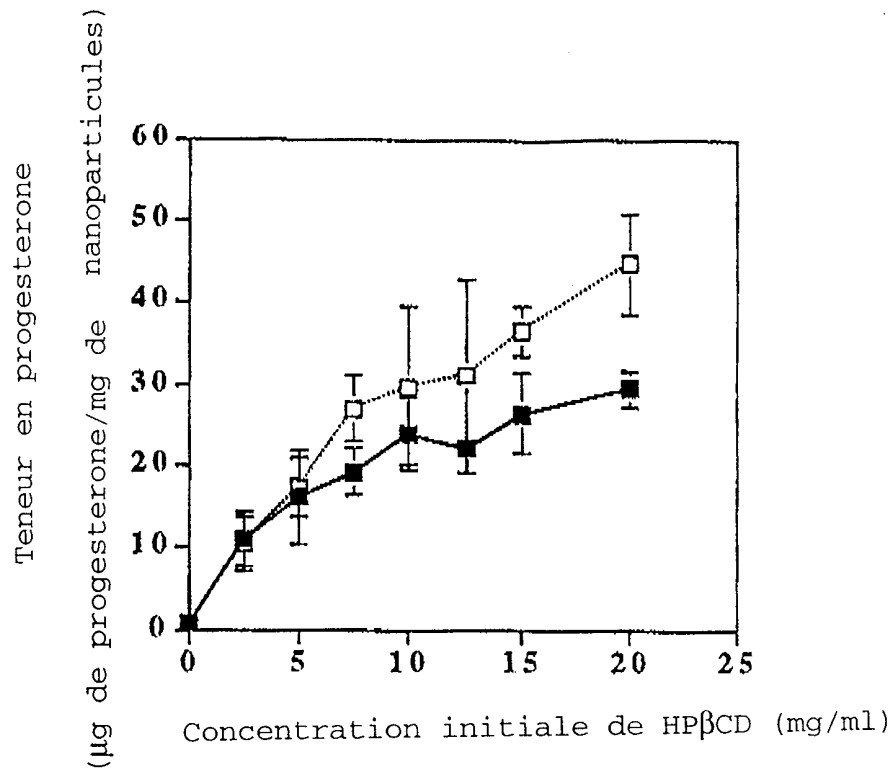


TENEUR EN HPβCD DANS DES NANOPARTICULES PRÉPARÉES EN PRÉSENCE DU COMPLEXE PROGESTERONE / HPβCD

■ avec 1 % de Poloxamer 188

□ sans Poloxamer 188

Fig. 5

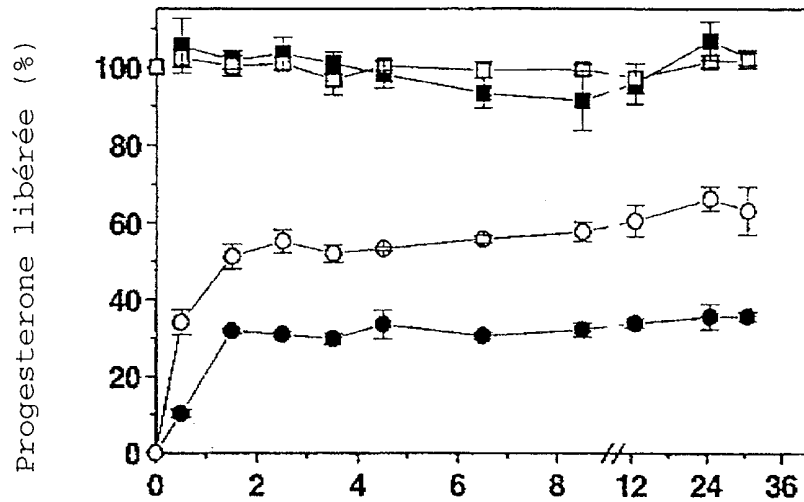


TENEUR EN PROGESTERONE DE NANOPARTICULES DE PIBCA / HPβCD

■ Avec Poloxamer 188

□ Sans Poloxamer 188

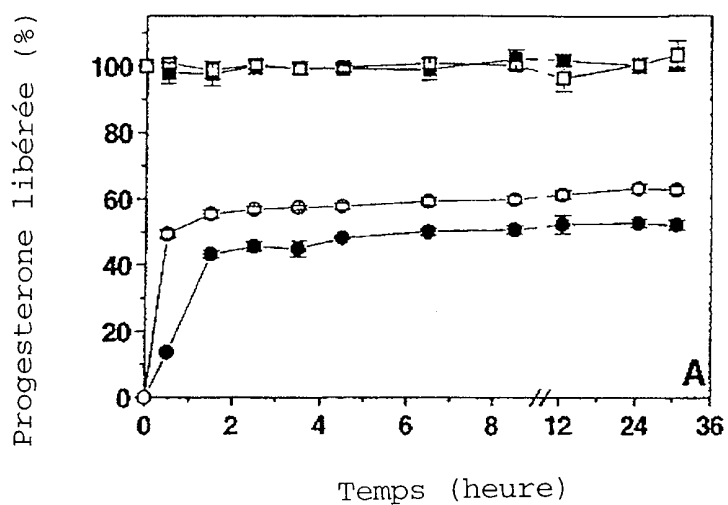
Fig. 6



INFLUENCE DE LA TAILLE DES PARTICULES SUR LA VITESSE DE LIBÉRATION DE LA PROGESTERONE DANS DU TAMPON AU BORATE ALCALIN (ABB : pH 8,4) A PARTIR DE NANOPARTICULES PIBCA / HPβCD.

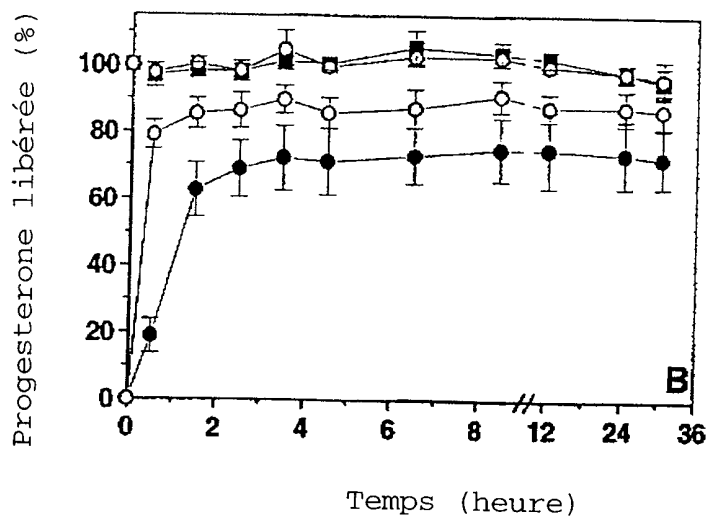
- Solution de progesterone
- HPβCD/ progesterone sous forme de complexe
- nanoparticules de 150 nm (PIBCA / HPβCD).
- nanoparticules de 70 nm (PIBCA / HPβCD).

Fig. 7 / A



A = ABB : PEG 400 (80 : 20)

Fig. 7 / B

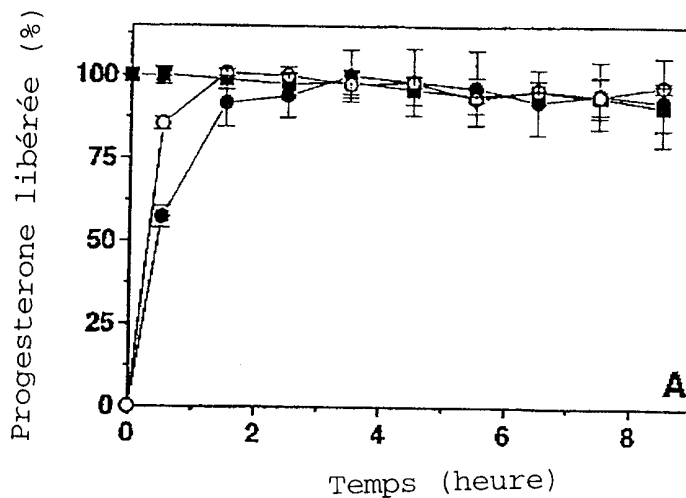


B = ABB : PEG 400 (60 : 40)

INFLUENCE DE LA CONSTITUTION DU MILIEU DE LIBÉRATION SUR LA VITESSE DE LIBÉRATION DE LA PROGESTERONE DANS DU MILIEU ABB (pH 8,4) A PARTIR DE NANOPARTICULES PIBCA / HPβCD.

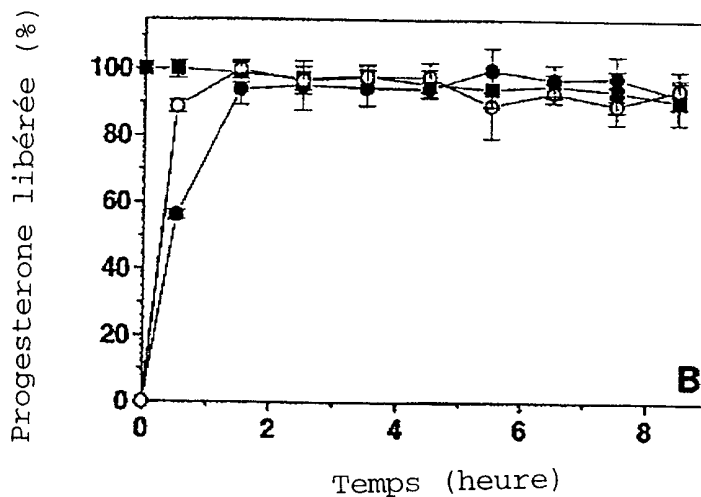
- Solution de progesterone
- HPβCD /progesterone sous forme de complexe
- nanoparticules de 150 nm
- nanoparticules de 70 nm

Fig. 8 / A



A = Milieu Esterase 25 UI

Fig. 8 / B

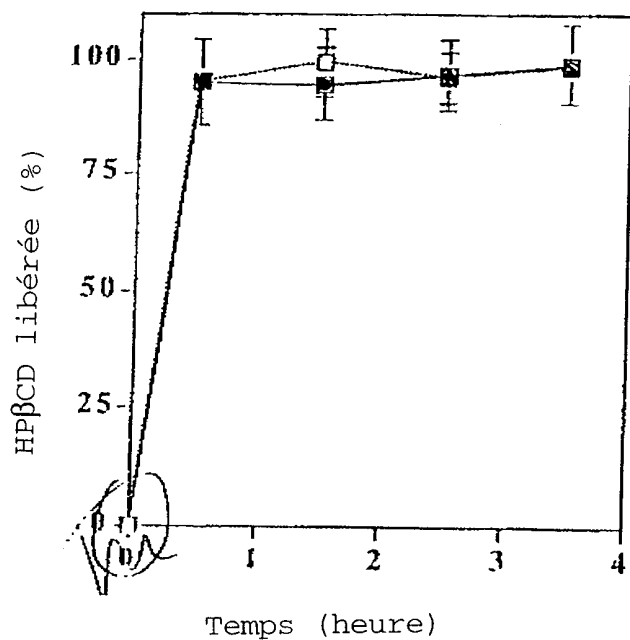


B = Esterase 100 UI

INFLUENCE DE LA PRÉSENCE D'ENZYMES DE TYPE ESTERASES SUR LA VITESSE DE LIBERATION DE LA PROGESTERONE DANS DU MILIEU ABB (pH 8,4) A PARTIR DE NANOPARTICULES DE PIBCA / HPβCD.

- Solution de progesterone
- HPβCD/progesterone sous forme de complexe
- nanoparticules de 150 nm
- nanoparticules de 70 nm

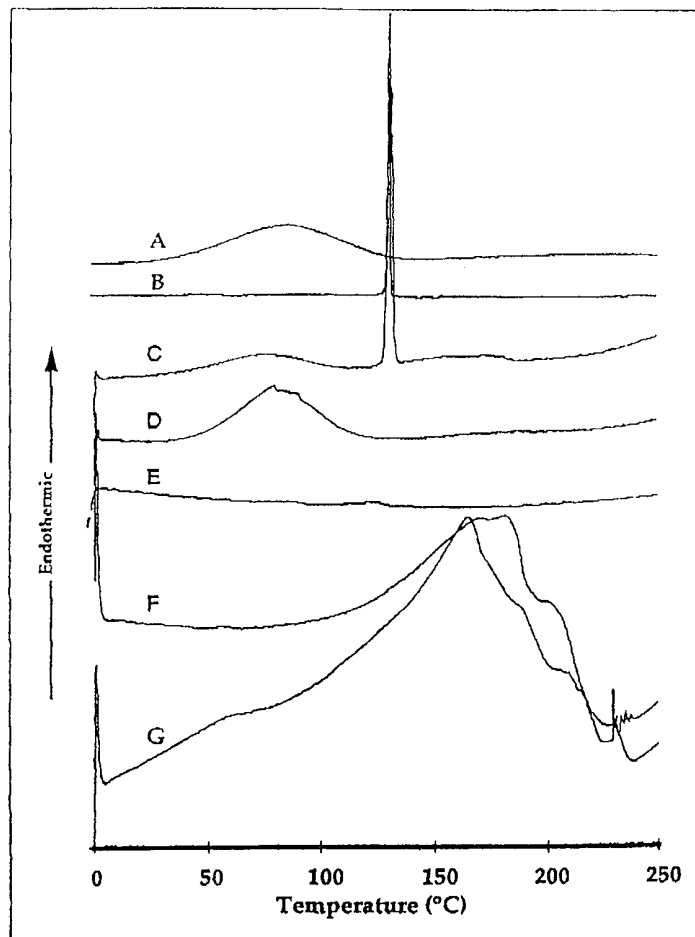
Fig. 9



VITESSE DE LIBERATION DE LA HPβCD DANS DU MILIEU ABB (pH 8,4) A PARTIR DE NANOPARTICULES PIBCA / HPβCD.

- nanoparticules de 150 nm
- nanoparticules de 70 nm

Fig. 10



COURBE DE CALORIMÉTRIE PAR ANALYSE DIFFÉRENTIELLE (DSC)
OBTENUES À UNE VITESSE D'ACCROISSEMENT DE LA TEMPÉRATURE DE
10°C / min.

A = HP β CD

B = Progesterone

C = Mélange physique de HP β CD Progesterone (5 : 1 W/W)

D = Complexe HP β CD : progesterone

E = PIBCA

F = Nanoparticules de PIBCA / HP β CD chargées en progesterone
(2,5 mg/ml de HP β CD)

G = Nanoparticules de PIBCA / HP β CD chargées en
progesterone (10,0 mg/ml de HP β CD dans le milieu.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 99/00418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 A61K47/48 A61K9/51

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)
 IPC 6 A61K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MONZA DA SILVEIRA A ET AL: "Combined poly(isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs." PHARM RES, JUL 1998, 15 (7) P1051-5, XP002085312 UNITED STATES see abstract see the whole document ---	1-23
X	EGEEA, MARIA ANTONIA ET AL: "Entrapment of cisplatin into biodegradable poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles" FARMACO, 1994, 49, 211-17, XP002085314 see abstract see page 215 - page 216 --- -/--	1-3,6-8, 11-22

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in 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

27 May 1999

Date of mailing of the international search report

10/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gonzalez Ramon, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00418

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 641 515 A (RAMTOOLA ZEIBUN) 24 June 1997 see abstract see column 2, line 25-40; claims 4,11,21; examples 1-3 ---	1,2,6-8, 12-22
X	WO 92 04916 A (ST GEORGE S ENTERPRISES LTD) 2 April 1992 see page 69, paragraph 3 - page 70, paragraph 3 ---	1-4,6-8, 12,13
Y	US 4 913 908 A (COUVREUR PATRICK ET AL) 3 April 1990 see abstract; claims 24-29; examples 8,12,13 ---	1-23
Y	WO 93 25195 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;SKIBA MOHAMED (FR); WOUESSIDJEWE DENIS (FR) 23 December 1993 see abstract; claims 5,6; examples 16,17 ---	1-23
Y	BAPAT, NITEEN ET AL: "Uptake capacity and adsorption isotherms of doxorubicin on polymeric nanoparticles: effect of methods of preparation" DRUG DEV. IND. PHARM., 1992, 18, 65-77, XP002085319 see abstract ---	14-21
T	FATTAL E ET AL: "Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 53, no. 1-3, 30 April 1998, page 137-143 XP004121264 see conclusion see page 139; figure 1 ---	1-23
A	COUVREUR P.: "Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers" CRC CRIT. REV. THER. DRUG CARRIER SYST., 1988, 5/1 (1-20), XP002085327 USA see page 13 - page 17 ---	1-23
A	SALINAS, C ET AL: "Coadjuvant effect in Combinations of carboplatin and poly(alkyl cyanoacrylate)." CIENC. PHARM., 1993, 3, 253-62, XP002085318 see abstract ---	1-23
--- -/--		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00418

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>GIBAUD S ET AL: "Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for granulocyte -colony stimulating factor (G-CSF)" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 52, no. 1-2, 2 March 1998, page 131-139 XP004113661 see abstract see page 132, column 2</p>	<p>1,2,6-8, 12-22</p>
X,P	<p>DUCHENE DOMINIQUE_(A): "Cyclodextrins in targeting: Application to nanoparticles." ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, 1999, XP002104026 see abstract see the whole document</p>	<p>1-23</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00418

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5641515 A	24-06-1997	IE 950237 A	16-10-1996
		AU 5286796 A	23-10-1996
		CA 2217485 A	10-10-1996
		EP 0820300 A	28-01-1998
		WO 9631231 A	10-10-1996
		JP 11503148 T	23-03-1999
		NZ 304976 A	29-04-1999
		ZA 9602671 A	09-10-1996
WO 9204916 A	02-04-1992	AT 166233 T	15-06-1998
		AU 8514291 A	15-04-1992
		DE 69129463 D	25-06-1998
		DE 69129463 T	17-09-1998
		EP 0548157 A	30-06-1993
		EP 0861667 A	02-09-1998
		AU 1153692 A	17-08-1992
		CA 2099869 A	08-07-1992
		DE 69218403 D	24-04-1997
		DE 69218403 T	26-06-1997
		WO 9211846 A	23-07-1992
		EP 0566590 A	27-10-1993
		JP 6504274 T	19-05-1994
		US 5614652 A	25-03-1997
		AU 670755 B	01-08-1996
		AU 2481792 A	05-04-1993
		EP 0601010 A	15-06-1994
		FI 940923 A	25-02-1994
		WO 9305174 A	18-03-1993
		JP 7500724 T	26-01-1995
NO 940658 A	25-02-1994		
US 5554498 A	10-09-1996		
US 4913908 A	03-04-1990	FR 2504408 A	29-10-1982
		AT 386550 B	12-09-1988
		AT 159782 A	15-02-1988
		CA 1205015 A	27-05-1986
		EP 0064967 A	17-11-1982
		JP 1731974 C	17-02-1993
		JP 4019207 B	30-03-1992
		JP 57190646 A	24-11-1982
WO 9325195 A	23-12-1993	FR 2692168 A	17-12-1993
		AT 141161 T	15-08-1996
		DE 69304065 D	19-09-1996
		DE 69304065 T	20-03-1997
		EP 0646003 A	05-04-1995
		ES 2091012 T	16-10-1996
		JP 7507784 T	31-08-1995
		US 5718905 A	17-02-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la demande internationale No

PCT/FR 99/00418

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K47/48 A61K9/51

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)

CIB 6 A61K

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	<p>MONZA DA SILVEIRA A ET AL: "Combined poly(isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs." PHARM RES, JUL 1998, 15 (7) P1051-5, XP002085312 UNITED STATES voir abrégé voir le document en entier ---</p>	1-23
X	<p>EGEA, MARIA ANTONIA ET AL: "Entrapment of cisplatin into biodegradable poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles" FARMACO, 1994, 49, 211-17, XP002085314 voir abrégé voir page 215 - page 216 ---</p>	1-3, 6-8, 11-22
	-/--	

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

27 mai 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/06/1999

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

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gonzalez Ramon, N

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De le Internationale No
PCT/FR 99/00418

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 641 515 A (RAMTOOLA ZEIBUN) 24 juin 1997 voir abrégé voir colonne 2, ligne 25-40; revendications 4,11,21; exemples 1-3 ---	1,2,6-8, 12-22
X	WO 92 04916 A (ST GEORGE S ENTERPRISES LTD) 2 avril 1992 voir page 69, alinéa 3 - page 70, alinéa 3 ---	1-4,6-8, 12,13
Y	US 4 913 908 A (COUVREUR PATRICK ET AL) 3 avril 1990 voir abrégé; revendications 24-29; exemples 8,12,13 ---	1-23
Y	WO 93 25195 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;SKIBA MOHAMED (FR); WOUESSIDJEWÉ DENIS (FR) 23 décembre 1993 voir abrégé; revendications 5,6; exemples 16,17 ---	1-23
Y	BAPAT, NITEEN ET AL: "Uptake capacity and adsorption isotherms of doxorubicin on polymeric nanoparticles: effect of methods of preparation" DRUG DEV. IND. PHARM., 1992, 18, 65-77, XP002085319 voir abrégé ---	14-21
T	FATTAL E ET AL: "Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 53, no. 1-3, 30 avril 1998, page 137-143 XP004121264 see conclusion voir page 139; figure 1 ---	1-23
A	COUVREUR P.: "Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers" CRC CRIT. REV. THER. DRUG CARRIER SYST., 1988, 5/1 (1-20), XP002085327 USA voir page 13 - page 17 ---	1-23
A	SALINAS, C ET AL: "Coadjuvant effect in Combinations of carboplatin and poly(alkyl cyanoacrylate)." CIENC. PHARM., 1993, 3, 253-62, XP002085318 voir abrégé ---	1-23
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: .e internationale No

PCT/FR 99/00418

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	GIBAUD S ET AL: "Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for granulocyte -colony stimulating factor (G-CSF)" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 52, no. 1-2, 2 mars 1998, page 131-139 XP004113661 voir abrégé voir page 132, colonne 2 -----	1,2,6-8, 12-22
X,P	DUCHENE DOMINIQUE_(A): "Cyclodextrins in targeting: Application to nanoparticles." ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, 1999, XP002104026 voir abrégé voir le document en entier -----	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De le internationale No

PCT/FR 99/00418

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5641515 A	24-06-1997	IE 950237 A	16-10-1996
		AU 5286796 A	23-10-1996
		CA 2217485 A	10-10-1996
		EP 0820300 A	28-01-1998
		WO 9631231 A	10-10-1996
		JP 11503148 T	23-03-1999
		NZ 304976 A	29-04-1999
		ZA 9602671 A	09-10-1996
WO 9204916 A	02-04-1992	AT 166233 T	15-06-1998
		AU 8514291 A	15-04-1992
		DE 69129463 D	25-06-1998
		DE 69129463 T	17-09-1998
		EP 0548157 A	30-06-1993
		EP 0861667 A	02-09-1998
		AU 1153692 A	17-08-1992
		CA 2099869 A	08-07-1992
		DE 69218403 D	24-04-1997
		DE 69218403 T	26-06-1997
		WO 9211846 A	23-07-1992
		EP 0566590 A	27-10-1993
		JP 6504274 T	19-05-1994
		US 5614652 A	25-03-1997
		AU 670755 B	01-08-1996
		AU 2481792 A	05-04-1993
		EP 0601010 A	15-06-1994
		FI 940923 A	25-02-1994
		WO 9305174 A	18-03-1993
		JP 7500724 T	26-01-1995
NO 940658 A	25-02-1994		
US 5554498 A	10-09-1996		
US 4913908 A	03-04-1990	FR 2504408 A	29-10-1982
		AT 386550 B	12-09-1988
		AT 159782 A	15-02-1988
		CA 1205015 A	27-05-1986
		EP 0064967 A	17-11-1982
		JP 1731974 C	17-02-1993
		JP 4019207 B	30-03-1992
		JP 57190646 A	24-11-1982
WO 9325195 A	23-12-1993	FR 2692168 A	17-12-1993
		AT 141161 T	15-08-1996
		DE 69304065 D	19-09-1996
		DE 69304065 T	20-03-1997
		EP 0646003 A	05-04-1995
		ES 2091012 T	16-10-1996
		JP 7507784 T	31-08-1995
		US 5718905 A	17-02-1998