

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 12.01.00.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 13.07.01 Bulletin 01/28.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *BIOVECTOR THERAPEUTICS*
Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : DE MIGUEL IGNACIO, IMBERTIE
LAURENT et BETBEDER DIDIER.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 **MATRICES POLYMERIQUES AMPHIPHILES ET IONIQUES ET DERIVES DE TELLES MATRICES.**

⑤7 La présente invention concerne un nouveau type de
matrices polymériques amphiphiles et ioniques comportant
une matrice hydrophile macromoléculaire portant une charge
ionique positive ou négative et dans laquelle est incorpo-
rée une phase lipidique de signe contraire à celui de la
matrice. L'invention se rapporte également à leur méthode
de fabrication et leur utilisation.



La présente invention concerne un nouveau type de matrices polymériques
5 caractérisées en ce qu'elles portent une charge positive ou négative et dans lesquelles
est incorporée une phase lipidique de charge opposée à celle de la matrice. L'invention
se rapporte également à leur méthode de fabrication et leur utilisation.

La recherche de nouveaux systèmes de délivrance de médicaments est
aujourd'hui quelque chose d'indispensable pour le développement de nouveaux
10 produits pharmaceutiques. En effet, la recherche pharmaceutique a produit une énorme
quantité de principes actifs extrêmement efficaces, mais parfois difficiles à administrer
car ils sont par exemple hydrophobes ou trop insolubles ou présentant des effets
secondaires non négligeables. La recherche actuelle s'oriente sur l'amélioration des
15 modes d'administration de ces nouvelles molécules pour produire des formes
pharmaceutiques acceptables selon les voies d'administration, pour explorer de
nouvelles voies d'administration, pour cibler de façon préférentielle les foyers de la
maladie ou pour relarguer les médicaments de façon contrôlée afin de diminuer le
nombre d'administrations ou de limiter les effets secondaires indésirables.

La recherche actuelle porte donc en particulier sur le développement de
20 nouveaux systèmes de relargage et de stabilisation de principes actifs.

Dans le cadre des systèmes dispersés, on peut citer par exemple les liposomes,
constitués en général d'un feuillet de phospholipides (Liposome : a practical approach,
1990, RRC New (Ed), LRL Press, Oxford University Press). L'homme du métier sait
maintenant fabriquer des liposomes uni ou multi lamellaires, uni ou multi vésiculaires.
25 Les liposomes peuvent transporter des composés polaires à l'intérieur, ils peuvent
aussi transporter des composés hydrophobes dans leur feuillet phospholipidique ainsi
que solubiliser des composés « difficiles », grâce au caractère particulièrement
détergent du feuillet lipidique. Ces particules possèdent toutefois l'inconvénient d'être
relativement instables, difficiles à fabriquer de manière contrôlée et présentant des
30 problèmes de fuite du principe actif.

Pour palier aux problèmes des liposomes, d'autres approches ont été proposées
dans le but d'augmenter la stabilité mécanique ou bien les propriétés d'incorporation

des principes actifs. On trouve ainsi : les lipobeads (Pin et al, FEBS Letters 1996, 397, p.70-4), les liposomes à cœur solide (EP 277776 The University of Tennessee Research Corporation), les BVSM™ (EP 687173 Biovector Therapeutics) où la matrice ionique est à l'intérieur de la structure et permet d'incorporer les actifs par interactions ioniques.

En ce qui concerne les matrices ou systèmes de relargage contrôlé, il existe :

- des hydrogels amphiphiles (WO 97/00275 GelSciences ; Koller et al, STP Pharma 1987, 3, p.115-24): ces gels sont essentiellement utilisés pour des principes actifs hydrophobes ou macromoléculaires. Certains de ces gels ont des propriétés de changement d'état en fonction de la température, qui peuvent être exploités au relargage d'actifs (thermosensibilité).
- Les matrices réticulées ou non, ioniques (Irwing, Drug Development and Industrial Pharmacy, 1987, 13, p.2047-66 ; WO 94/20078 Biovector Therapeutics). De telles matrices peuvent être chargées positivement ou négativement par greffage de charges ioniques appropriées et l'homme du métier connaît les différents procédés de fabrication. L'homme du métier sait fabriquer des particules de taille prédéterminées à partir de ces matrices, par exemple par extrusion. Ces matrices peuvent être utilisées pour la stabilisation et le relargage de composés polaires en utilisant les mécanismes d'échange d'ions. Mais ces mécanismes sont difficiles à contrôler.

On a ensuite cherché à combiner ionicité et hydrophobie, en particulier pour pouvoir charger des principes actifs hydrophobes et chargés. Dans ce cadre, on a synthétisé des block copolymères avec des parties hydrophobes et hydrophiles chargées (Brevet US Re 35068, MIT ; demande de brevet WO 95/24430 University of Washington, Alcon Lab. Inc.). Ces gels ont été principalement étudiés car ils peuvent avoir des changements d'état en fonction de la température, du pH et de la force ionique. Il est clair que ce mélange d'hydrophobie et d'ionicité est utile pour la solubilisation et la stabilisation de composés amphiphiles ou insolubles. Toutefois, une restriction de ce système est que la distribution hydrophobie et ionicité n'est pas homogène dans l'ensemble du gel et dépend notamment de la taille, de la forme et de

l'arrangement des monomères en cours de synthèse. On aura donc toujours des parties apolaires et des parties ioniques distinctes .

Par ailleurs les propriétés physico-chimiques de telles matrices sont déterminées par leur synthèse et ne sont pas modulables ultérieurement. Pour obtenir
5 des matrices avec des propriétés d'hydrophobie ou d'ionocité différentes, différentes synthèses sont nécessaires.

La Demanderesse apporte une réponse originale à ce problème de développement de nouveaux systèmes associant de propriétés d'hydrophobie et d'ionocité.

10 Ainsi, la Demanderesse a mis en évidence de nouvelles matrices polymériques qui possèdent des propriétés d'ionocité et d'hydrophobicité très intéressantes réparties de façon homogène dans ladite matrice. Par ailleurs, un des avantages des matrices selon l'invention est que le caractère hydrophobe et/ou ionique de la matrice peut être modulé de façon très simple, sans qu'il ne soit besoin de changer de nombreux
15 paramètres.

Ainsi, l'invention concerne des matrices polymériques, caractérisées en ce qu'elles comportent une matrice hydrophile macromoléculaire, non liquide portant une charge ionique positive ou négative et dans laquelle est incorporée une phase lipidique de charge opposée à celle de la matrice.

20 De façon très intéressante, les matrices polymériques selon l'invention présentent un caractère amphiphile et ionique, dispersé de façon homogène dans la matrice. Ce caractère est modulable en fonction de la quantité et de la nature des lipides incorporés dans la matrice polymérique hydrophile de départ.

De préférence, la matrice hydrophile est constituée de polymère linéaire ou
25 ramifié dont la charge ionique est naturellement ou chimiquement greffée. Le polymère peut être naturel ou synthétique, homopolymère ou copolymère (bloc (block), greffé (graft) ou aléatoire (random)) ou un mélange de polymères. Des polymères ioniques contenant déjà des parties hydrophobes (que ce soient des copolymères blocs ou des copolymères à chaînes pendantes) peuvent aussi être utilisés
30 pour la mise en œuvre de l'invention, du moment que l'insertion d'une phase lipidique permette de moduler l'hydrophobie de ces polymères.

De façon préférée, le polymère linéaire ou ramifié est un polymère polyhydroxylé, c'est-à-dire que chaque monomère possède au moins un groupement hydroxyle libre.

5 Dans un mode préféré de l'invention, la matrice est notamment constituée de polysaccharides ou d'oligosaccharides, mais on peut également utiliser d'autres polymères, comme les exemples le démontrent. Lorsque l'on utilise un polysaccharide, il est choisi de préférence parmi le dextrane, le chitosan, l'amidon, l'amylose ou amylopectine ou mélanges, la cellulose, le polygalactose, le polymannose et leurs dérivés.

10 La matrice de l'invention peut être aussi composée de polymères ioniques naturels ou synthétiques comme les alginates ou le carbopol, connus pour leur propriété de formation de matrice de façon spontanée en présence d'ions multivalents.

La matrice polymérique selon l'invention comprend une matrice hydrophile qui peut être réticulée naturellement ou chimiquement.

15 Les modes de réticulation de polysaccharides ou de polymères polyhydroxylés sont connues de l'homme de l'art et impliquent classiquement des réactifs bifonctionnels comme l'épichlorhydrine et les bi-epoxydes (conduisant à des réticulations de type di-éther), les dérivés de l'acide phosphorique comme l'oxychlorure de phosphore ou le trimétaphosphate (conduisant à des réticulations de type diester de phosphate) ou encore les acides dicarboxyliques (conduisant à des réticulations type diesters). Cette description n'est pas limitative et d'autres agents de réticulation dits « classiques » peuvent être utilisés pour l'obtention de matrices hydrophiles réticulées.

25 La matrice polymérique peut être chargée positivement ou négativement, par greffage de groupements ioniques, cationiques ou anioniques, aux monomères, de préférence des sucres, composant le polymère. Ces groupements peuvent être choisis parmi des fonctions ammoniums quaternaires ou amines tertiaires, phosphates, sulfates, carboxyéthyles, succinates... Les procédés de greffage de charges sont bien connus de l'homme du métier.

30 La phase lipidique pénétrant les polymères peut être constituée de différents types de lipides naturels ou synthétiques, parmi lesquels :

- les lipides anioniques en général, en particulier les phospholipides anioniques comme le phosphatidyl glycérol ou la phosphatidyl sérine (et en particulier le DPPG (diacyl phosphatidyl glycérol) et la DPPS (diacyl phosphatidyl sérine)), les acides phosphatidiques, les tensioactifs anioniques comme les sels d'acides gras à longue chaîne, les acides gras à courte ou longue chaîne, les cardiolipines, les alkyl sulfates, les glycérides sulfatés, les alkylpolyethoxy éther sulfates, les alkylpolyethoxy éther carboxylates, les alkyl sulfonates, les phosphates de mono ou dialkyle
- des composés cationiques comme les alkyl ou dialkyl ammoniums (en particulier les diacyl diméthyl ammonium, et les acyltriméthylammonium), les alkyl pyridiniums, les phospholipides et phosphonolipides cationiques les tensioactifs cationiques, les lipides cationiques, en particulier de dernière génération comme le DOGS, le DOTAP, l'acylcarnitine, les esters des bétaines à longue chaîne.

15 Cette liste n'est pas limitative. Des exemples de molécules lipidiques ou tensioactives ioniques peuvent être trouvés dans des ouvrages de galénique générale, par exemple : Puisieux et Seiller, Galenica 5. Agents de surface et émulsions. 1989. Tech. & Doc. Lavoisier.

20 Les lipides pouvant être utilisés pour l'invention sont des composés insolubles dans l'eau, ayant tendance à être sous forme micellaire (détergent) ou sous forme lamellaire (phospholipides). La pénétration est induite par un apport d'énergie (température) permettant de fluidifier les lipides et permettant que l'interaction ionique soit effective. Une fois que les lipides ont pénétré, la baisse de température permet le piégeage des lipides de façon permanente.

25 Tous les lipides chargés ne sont cependant pas adaptés à une mise en œuvre de l'invention. En effet, les lipides chargés trop solubles auront tendance à sortir de la matrice lorsque celle-ci est placée dans un milieu ionique par un mécanisme d'échange d'ions.

30 Les lipides préférés sont ceux de type phospholipides anioniques ou leurs analogues cationiques, c'est à dire, les groupements chargés dérivés par 2 ou plusieurs chaînes d'acides gras dont la solubilité dans l'eau est si basse que l'on considère qu'ils sont toujours sous forme organisée.

En ce qui concerne les molécules tensioactives plus classiques ou formées d'un groupement ionique dérivé par une seule chaîne hydrophobe, il est difficile de dire où se trouve la frontière de solubilité permettant d'obtenir des matrices amphiphiles stables. La Demanderesse a déterminé que les tensioactifs de type sodium dodécyl sulfate sont à la limite de cette solubilité.

Cependant, étant donné que des mélanges complexes de tensioactifs peuvent être envisagés, l'utilisation d'agents tensioactifs plus hydrophiles peut aussi être possible en fonction des propriétés que l'on désire donner à la matrice hydrophile.

La Demanderesse a donc montré que des mélanges de lipides de charge opposée à la matrice sont envisageables pour modifier les propriétés de celle-ci et a trouvé que la pénétration de lipides de charge opposée permet d'incorporer aussi des lipides neutres qui n'auraient pas pénétré autrement. La phase lipidique peut donc également contenir de tels lipides.

Ainsi des mélanges complexes peuvent être envisagés pour contrôler de façon très fine les propriétés de la matrice. En effet, en particulier lorsque l'on veut augmenter l'hydrophobicité globale de la matrice polymérique selon l'invention, sans toutefois trop modifier la charge, on peut mélanger des lipides chargés et des lipides neutres : cholestérol, phospholipides neutres, vitamines etc...

De façon surprenante, les lipides incorporés dans le polymère hydrophile s'organisent de telle façon que la zone hydrophobe est homogène et est stable dans la matrice.

Des études ont montré que quels que soient la quantité et le type de lipide incorporé, celui-ci se répartit de façon homogène dans la matrice. On a prouvé par exemple, dans le cas des phospholipides anioniques qui forment spontanément des liposomes, que ces phospholipides s'organisent à l'intérieur de la matrice sous une forme inconnue, mais qui présente des caractéristiques de bicouche lipidique et notamment la présence d'une température de transition.

La Demanderesse a montré que les matrices se compactent de plus en plus en fonction de leur charge en lipide. Cette compaction ne peut être expliquée que par une interaction hydrophobe entre les contre-ions lipidiques et non pas par un phénomène de neutralisation de charge, car il a été montré qu'en neutralisant la charge avec des

contre-ions moins lipidiques (acides gras à courte chaîne), cette compaction ne se fait plus.

La répartition homogène des lipides chargés dans la matrice et sa compaction montrent que la structure obtenue résulte de la compétition entre interaction ionique (qui aurait tendance à disperser les lipides dans la matrice) et l'interaction hydrophobe qui a tendance à regrouper les lipides. On peut donc certainement parler de matrice ionique et amphiphile.

Une deuxième conséquence importante de cette compaction est que des matrices amphiphiles vésiculaires peuvent être obtenues grâce à cette composante hydrophobe.

En effet, il est possible d'obtenir des matrices amphiphiles simplement en utilisant des polymères ramifiés de taille suffisamment grande. Ainsi, la Demanderesse a montré (exemple 12) qu'en utilisant des molécules d'amylopectine (polysaccharide naturellement ramifié) cationisées, de poids moléculaire très élevé (jusqu'à 100 millions Daltons), on peut obtenir des matrices amphiphiles vésiculaires dont la taille est d'environ 100 à 250 nm. En effet, l'incorporation de la phase lipidique de charge opposée dans ce type de polymère provoque une contraction spontanée des molécules de polymère par interaction hydrophobe et la formation de matrices amphiphiles nanométriques efficaces pour le transport des principes actifs.

L'existence d'une telle structure unique permet notamment de résoudre les problèmes posés lors de l'encapsulation de principes actifs possédant des propriétés les rendant peu ou non solubles dans l'eau, ou qui possèdent des caractéristiques amphiphiles.

Ainsi, ces propriétés tout à fait particulières (une certaine hydrophobie, tout en gardant des caractéristiques de charge ionique) permettent :

- la mise en suspension de composés très insolubles, de préférence ceux qui ont une charge opposée à la matrice (amphotéricine, ketoconazole, antifongiques en général, anticancéreux, etc...),
- la mise en suspension de composés très hydrophobes, de préférence de charge opposée à la matrice (vitamines, acide trans-rétinoïque, hormones, antidépresseurs), mais qui peuvent également être neutres

(en particulier les hormones apolaires telles que l'estradiol, le valérate d'estradiol, les prostaglandines à action centrale),

- la stabilisation de composés polaires de charge opposée à celle de la matrice, qui sont incorporés par interaction ioniques, et dont la molécule peut posséder une partie apolaire,
- la stabilisation de peptides thérapeutiques (en particulier l'insuline, l'HgH, l'HPTH, des antigènes).

La topologie particulière des matrices polymériques selon l'invention (constitués d'une matrice amphiphile) permet donc d'encapsuler et de stabiliser des principes actifs variés, possédant des propriétés hydrophobe et/ou polaire, de les véhiculer et de les délivrer. La méthode de délivrance / relargage contrôlé et/ou retardé dépendra des caractéristiques d'ionicité et d'hydrophobie de la matrice, de sa taille et/ou de sa forme. On peut ainsi formuler des principes actifs qui étaient instables dans les systèmes précédemment développés, ainsi que les protéger du milieu environnant dans le cas, par exemple d'une administration par voie orale.

Parmi ces molécules, on peut citer, sans que cette liste ne soit limitative :

- les antibiotiques et antiviraux
- les protéines, protéoglycanes, peptides
- les liposaccharides
- les antidépresseurs
- les hormones
- les antigènes
- les insecticides et fongicides
- les composés agissant sur le système cardiovasculaire
- les composés agissant sur le système nerveux central
- les anticancéreux
- les anti-malariques
- les anti-asthmatiques
- les composés présentant une action sur la peau
- les acides nucléiques (ADN, ARN, nucléotides, par exemple)

La forme que l'on décidera de donner ultérieurement à une telle matrice polymérique sera définie en fonction de l'application envisagée. Elle peut, en

particulier, être choisie dans le groupe comprenant les films, les composants des patches, les particules visibles, microparticules, nanoparticules. De tels dérivés de la matrice polymérique font également partie de l'invention.

5 Quelle que soit la forme que l'on désire donner à la matrice selon l'invention, il est à noter que l'on peut faire pénétrer les lipides à l'intérieur de la matrice de départ après que celle-là a été déterminée. De façon inverse, on peut également préparer les matrices polymériques amphiphiles selon l'invention et les modeler ultérieurement.

La Demanderesse a trouvé que la capacité de charge en lipide de ces matrices est liée à leur capacité de charge ionique. Ainsi lorsque l'on veut préparer des nanoparticules dispersées, le taux de charge en lipides est limité autour de 60-80% de neutralisation de la charge. A partir de cette limite on observe des phénomènes de précipitation car les particules deviennent trop hydrophobes. On peut alors optionnellement les stabiliser en utilisant des émulsifiants classiques neutres, que ce soient des détergents, tensioactifs ou phospholipides qui sont non ioniques ou
15 zwitterioniques.

Les différentes possibilités de forme de la matrice permettent d'envisager leur utilisation pour l'administration de molécules par:

- voie intraveineuse
- voie intramusculaire (y compris sous forme dépôt)
- 20 - voie transdermique
- voie sous cutanée
- voie orale.

Ces matrices selon l'invention devraient maintenir les propriétés connues de mucoadhésion conférées par le polymère ionique, et il est même probable que ces propriétés soient augmentées par la partie hydrophobe.
25

Ainsi, ces matrices sont en particulier efficaces pour :

- le relargage de molécules par voie mucosale (en particulier nasale, vaginale, buccale)
- le transport d'antigènes à usage vaccinal (en particulier par voie
30 mucosale, notamment par voie nasale)
- le transport d'oligonucléotides (ADN, ARN ou similaires) par voie mucosale

- la délivrance de peptides en particulier par voie mucoale.

On peut également administrer les composés selon l'invention par voie dermique, en particulier en tant que « patch ».

Les matrices polymériques selon l'invention peuvent être stérilisées. Elles peuvent également être congelées.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une matrice polymérique, caractérisé en ce que :

- a) On prépare une matrice polymérique hydrophile portant une charge globale positive ou négative.
- b) On prépare la solution de lipides de charge opposée à celle de la matrice.
- c) On effectue un mélange des deux solutions sous agitation, de telle façon que la phase lipidique pénètre entièrement dans la matrice polymérique ou le noyau.

L'homme du métier pourra optimiser les conditions pour que la phase lipidique pénètre entièrement dans la matrice polymérique ou le noyau (en particulier les différentes proportions et les temps de contact). Il peut parfois être nécessaire de chauffer la phase lipidique à une température suffisante afin de la fluidifier et de faciliter son entrée dans la phase polymérique. Les conditions de températures dépendent du type de lipides et de la matrice polymérique utilisés. Toutefois, d'une manière générale, les températures utiles pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention seront comprises dans une gamme allant de 20 à 95°C, de manière préférée de 40 à 80°C.

Les avantages de ces matrices polymériques sont notamment :

- une grande stabilité chimique et thermique, due à la structure polymérique de la matrice solide, et aux interactions stabilisant la phase lipidique à l'intérieur de celle-ci.
- La possibilité de moduler et définir la charge globale et le caractère hydrophobe, en faisant varier les polymères, leur taux de dérivation et les lipides choisis pour la préparation.
- une grande facilité de synthèse et d'industrialisation, avec un nombre d'étapes réduit.

- leur capacité à stabiliser des composés hydrophobes et/ou polaires difficiles à intégrer dans des vecteurs classiques.
- la possibilité de modifier la délivrance du principe actif en modulant les charge et hydrophobie globales du vecteur particulaire ainsi que sa taille et sa forme.
- une propriété de muco-adhésion permettant l'utilisation et la délivrance du principe actif, notamment par voie orale ou mucoale.

Les principes actifs peuvent être introduits dans les matrices polymériques à différentes étapes de fabrication, en fonction de leur charge et de leur hydrophobicité. En particulier, il est intéressant de produire les matrices et de les charger en principe actif par la suite, mais il est également possible d'introduire le principe actif lors de la préparation de la phase lipidique et/ou de la fabrication du polymère sous agitation.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient une matrice polymérique selon l'invention dans laquelle est incorporé un principe actif, et un support pharmaceutiquement acceptable pour son administration. L'homme du métier sait choisir les supports acceptables pour une utilisation pharmaceutique. Les matrices selon l'invention sont notamment utiles pour des applications thérapeutiques et vaccinales. L'utilisation de matrices selon l'invention à titre de médicaments est également un objet de l'invention.

L'invention a également pour objet une composition cosmétologique, caractérisée en ce qu'elle contient une matrice polymérique telle que décrite précédemment dans laquelle est incorporé un principe actif à activité dermatologique et/ou cosmétique, et des excipients cosmétologiquement acceptables.

Enfin, les compositions alimentaires comprenant des matrices polymériques selon l'invention font partie de l'invention.

Les exemples qui suivent servent à illustrer certains aspects de l'invention, et ne doivent pas être considérés comme limitant ladite invention.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Fluorescence du mélange de particules cationiques / Liposomes à température ambiante. La pénétration des lipides (fluorescents) dans la matrice est étudiée en suivant le protocole de l'exemple 5.

Figure 2 : Fluorescence du mélange de particules cationiques / Liposomes à 80°C. La pénétration des lipides (fluorescents) dans la matrice est étudiée en suivant le protocole de l'exemple 5.

5 Figure 3 : Etude du taux d'hydratation du Sephadex A-50 en fonction du taux et du type de contre-ion lipidique. L'étude est effectuée en suivant le protocole de l'exemple 7. Les symboles utilisés sont : losange, C16 ; carré, C8 ; triangle, DPPG.

10 Figure 4 : Evolution de la polarisation de fluorescence du DPH en fonction de la température pour des matrices amphiphiles chargées en DPPG ou en palmitate. L'étude est effectuée suivant le protocole de l'exemple 7. M.A. : Matrice amphiphile. Les symboles utilisés sont : losange, M.A. C16 ; carré : M.A. DPPG.

Figure 5 : Evolution de la taille des matrices amphiphiles cationiques non réticulées en fonction du taux de lipides et du polymère utilisé. L'étude est effectuée suivant le protocole de l'exemple 12. Les symboles utilisés sont : losange, amylose cationisée ; carré, amylopectine cationisée.

15 Figure 6 : Taux de solubilisation de l'Amphotéricine B par les matrices amphiphiles cationiques non réticulées, en PBS. L'étude est effectuée suivant le protocole de l'exemple 13. Symboles, AmB : amphotéricine B, « + » : cationisée.

EXEMPLES

20 Exemple 1: Préparation de liposomes DPPG

4 g de DPPG (5,58 mmol, Lipoid KG, Allemagne) sont dispersés dans 250 ml d'une solution éthanol : eau (88 :12) contenant 3,4 g d'acétate de choline (21 mmol, Sigma, USA). La solution est chauffée à 60°C jusqu'à la complète dissolution des phospholipides.

25 12,5 ml de cette solution de DPPG sont injectés dans 87,5 ml d'eau à 80°C sous agitation magnétique, puis on laisse la solution revenir à température ambiante. On obtient une suspension translucide de liposomes de DPPG à 2 g/l présentant une taille autour de 100 nm, mesurée par dispersion de lumière dans un analyseur de particules submicronique type Coulter N4D (Coultronics, USA).

30 La solution est ensuite stockée à + 4°C.

Exemple 2: Préparation de matrices hydrophiles cationiques de plusieurs micromètres à base de polysaccharide

50 g de polysaccharide (amylopectine, Waxilys 200, Roquette Frères, France) sont dispersés dans 100 ml d'eau. Lorsqu'il n'y a plus de grumeaux, 25 ml de soude 10 M sont ajoutés. La solution alcaline de polysaccharide est maintenue sous agitation jusqu'à obtention d'une solution visqueuse translucide.

2,83 g d'épichlorhydrine (ECH, 30 mmol, Sigma, USA) sont alors ajoutés et après une nuit d'agitation douce à température ambiante on observe la gélification du polysaccharide. On ajoute 31,2 g de glycidyl triméthyl ammonium (GTMA, 200 mmol, Fluka, Suisse) et la réaction est maintenue sous agitation pendant 8 heures à température ambiante. A la fin de la réaction, 1 litre d'eau est ajouté et le pH de la solution est amené entre 5 et 7 à l'aide d'acide acétique. Le gel obtenu est lavé en réalisant plusieurs décantations en eau et la suspension est pré-homogénéisée avec un Ultra-Turrax modèle T-25 (IKA, Bioblock, France).

La suspension est alors homogénéisée à une pression de 50 bars à l'aide d'un homogénéisateur Minilab H-80 (Rannie, Danemark) afin d'obtenir des fragments de 1 à 50 μm qui sont visibles au microscope optique.

La-suspension de particules est alors centrifugée à 5000 g pendant 15 minutes (Centrifugeuse Sigma 3k-20, Bioblock, France) et le culot est récupéré avec de l'eau osmosée.

La suspension de particules est alors séchée par lyophilisation et l'on obtient 20 g de particules de polysaccharide réticulé cationisé présentant les caractéristiques suivantes :

Taille (microscopie optique) : 5-50 μm

Charge (Analyse élémentaire d'azote) : 1,75 mmol / g (groupements ammonium quaternaire par gramme de particules).

Exemple 3: Préparation de matrices hydrophiles cationiques submicroniques à base de polysaccharide.

50 g d'une maltodextrine (Glucidex 6, hydrolysate de polysaccharide Mw : 3400, Roquette Frères, France) sont solubilisés dans 80 ml d'eau puis 20 ml de soude 10M sont ajoutés. Dans la solution alcaline de polysaccharide maintenue sous

agitation, 3,54 g d'épichlorhydrine (38,3 mmol) sont ajoutés. Après une nuit d'agitation douce à température ambiante, la solution gélifie.

31,2 g de glycidyl triméthyl ammonium (200 mmol) sont ajoutés au gel et la réaction est laissée 8 heures sous agitation. Après la fin de la réaction, 1 litre d'eau est
5 ajouté et le pH de la solution est amené entre 5 et 7 à l'aide d'acide acétique. La suspension est pré-homogénéisée à l'aide d'un Ultra-Turrax T-25.

La suspension de particules est alors homogénéisée (Minilab H-80) à une pression variant entre 500 et 900 bars pour obtenir des particules ayant une taille inférieure à 100nm.

10 Les particules sont ensuite purifiées par ultrafiltration sur une membrane de 30 kDa (système Minisette, Filtron, USA). La suspension de particules est ensuite purifiée par micro filtration sur membrane de 0,2 μm (Spiral-Cap 0,2 μm , Gelman, USA) et stockée à 4°C.

Les caractéristiques de la suspension sont :

15 Taille (Coulter N4D) : 60 nm (S.D= 20 nm)
Charge (Analyse élémentaire) : 2 mmol / g
Potentiel Z (Malvern série 3000, Tampon phosphate 15 mM pH 7) : +
18 mV
Concentration : 17 g/l

20

Exemple 4: Préparation de matrices hydrophiles anioniques submicroniques à base de polysaccharide

50 g de Glucidex 6 sont solubilisés dans 200 ml d'eau osmosée puis 50 ml de soude 10 M sont ajoutés. Cette solution est réfrigérée à + 4°C et maintenue sous
25 agitation.

23 g d'oxychlorure de phosphore (150 mmol, Prolabo, France) sont ajoutés en même temps que 85,2 ml de soude 10M. L'ajout de ces 2 produits est réalisé de façon simultanée et pendant 2 heures. A la fin de l'ajout de réactifs, la réaction est laissée sous agitation pendant 1 heure. Dans ce cas la réticulation et la fonctionnalisation sont
30 réalisées en même temps car l'oxychlorure de phosphore a la propriété de réticuler par des fonctions phosphodiester et de greffer de la charge par une liaison mono ester de phosphate.

On ajoute alors 1 litre d'eau et le pH de la solution est amené entre 5 et 7 avec de l'acide acétique.

La solution est pré-homogénéisée avec un ultra-turax puis homogénéisée entre 500 et 900 bars pour obtenir des particules inférieures à 100 nm.

5 La solution est purifiée par ultra-filtration sur une membrane ayant un seuil de filtration de 30 Kda puis microfiltrée sur 0,2 µm.

On obtient une suspension de particules ayant les caractéristiques suivantes :

Taille (Coulter N4D) : 50 nm (S.D. 20 nm)

Charge totale (analyse phosphore total) : 2 mmol / g

10 Taux de réticulation (fonctions phosphodiester déduites par titrage) : 0,2 mmol / g

Potentiel Z (Tampon phosphate 15 mM, pH 7) : -21 mV

Concentration : 20 mg /ml

15 Exemple 5: Préparation d'une matrice amphiphile cationique de plusieurs micromètres avec des phospholipides anioniques

20 10 ml d'une suspension à 10 g/l de matrices hydrophiles cationiques synthétisées selon la méthode de l'exemple 2 est mélangée avec une solution de liposomes DPPG à 2 g/l (10 ml) fabriqués selon l'exemple 1. Le mélange est effectué à température ambiante.

Afin de suivre la pénétration des lipides dans la matrice cationique, la suspension de DPPG est additionnée au préalable de 50 µg d'une sonde fluorescente lipophile (5-HexaDecanoylAminoEosine). Cette sonde hydrophobe et neutre suit les lipides dans sa distribution et n'est fluorescente qu'en présence de lipides.

25 Un échantillon est observé au microscope de fluorescence (Nikon Eclipse T-300) et des photographies sont prises.

30 La figure 1 montre une fluorescence préférentiellement à la surface des particules indiquant que, à température ambiante, la phase lipidique ne peut pas pénétrer correctement le réseau polysaccharidique. L'interaction entre les liposomes anioniques et les particules cationiques est évidente mais on peut observer de la fluorescence diffuse dans l'arrière plan (excès de liposomes) indiquant la saturation de la surface de particules

Le même échantillon est traité à 80°C et on observe alors (Figure 2) une pénétration de la fluorescence beaucoup plus forte et une disparition de fluorescence dans l'arrière plan.

On peut aussi observer que quelle soit la taille des particules, la fluorescence
5 semble être répartie de façon homogène dans le volume de la particule.

Exemple 6: Préparation de matrices amphiphiles cationiques submicroniques avec des phospholipides anioniques

24 ml d'une solution à 17 g/l (408 mg de particules) en matrice hydrophile
10 cationique préparée suivant l'exemple 3 sont maintenus sous agitation à 80°C.

A l'aide d'une pompe péristaltique, 10,2 ml d'une solution éthanolique de DPPG à 16 g/l (éthanol : eau 88 :12, DPPG 163 mg) sont ajoutés lentement dans la solution de polysaccharide cationique. Après l'ajout de la totalité du DPPG, la solution est laissée sous agitation à 80°C durant 30 min. La solution est purifiée par ultra-
15 filtration sur une membrane ayant un seuil de filtration de 30 KDa.

Il en résulte une suspension de matrices amphiphiles submicroniques avec un rapport matrice : lipides de 40 % w/w. En tenant compte du taux de charge de la matrice (2 mmol / g) et du poids molaire du DPPG (722 Da), on peut conclure que le taux de neutralisation de la charge cationique par le DPPG est de 26 %.

20 Il en résulte 34 ml d'une suspension de particules submicroniques (100-150 nm mesurées au Coulter N4D) à 16,5 g /l. Le potentiel Z de ces matrices amphiphiles reste largement cationique (+ 15 mV mesuré dans du tampon phosphate 15 mM pH 7).

Exemple 7: Pénétration de différents lipides anioniques sur des matrices cationiques submicroniques. Caractérisation des systèmes. Limitation du type de lipides.

25

Afin de visualiser l'effet de la phase lipidique sur les propriétés physiques de la matrice hydrophile, nous avons étudié la pénétration de différents lipides anioniques sur une matrice hydrophile cationique commerciale, le Sephadex QAE A-50. Il s'agit de particules de dextran réticulé, fonctionnalisées par des fonction ammonium quaternaire et présentant une forme sphérique et une taille autour de 100 µm, ce qui les rend très utiles pour modéliser.
30

L'effet de l'association de différents types de lipides (DPPG, acide palmitique et l'acide octanoïque) est étudié sur des particules de QAE Séphadex A-50 en mesurant la modification de leur taux de gonflement (hydratation) pour différentes quantités de lipides.

5 Sur 300 mg de Sephadex à 10 g/l, différentes quantités de lipides sont ajoutées (voir Tableau I) et chauffées 30 min à 80°C. Le taux d'hydratation initial du Sephadex A-50 est de 65 ml /g. Le taux de charge cationique est de 3 mmol / g. Pour un même taux de neutralisation de charge, la masse de lipides à utiliser est proportionnelle à la masse molaire du lipide.

10

Tableau I. Rapport de masse de lipides / gel hydrophile pour différents lipides et différents taux de neutralisation (pour 1 g de Sephadex A-50).

| Taux de neutralisation de la charge du Séphadex | 10% | 33% | 65% | 100% |
|---|---------|--------|--------|--------|
| Masse de DPPG (MW : 722) | 0,22 g | - | 1,4 g | 2,2 g |
| Masse d'acide palmitique (MW : 255) | 0,076 g | 0,25 g | 0,49 g | 0,76 g |
| Masse d'acide octanoïque (MW : 143) | 0,043 g | 0,14 g | 0,28 g | 0,43 g |

15 Le taux de gonflement est mesuré pour chaque type de lipides en fonction du taux de neutralisation de la charge (Figure 3). On observe que le DPPG et l'acide palmitique se comportent de la même façon, provoquant une forte contraction du gel due aux interactions hydrophobes entre les chaînes d'acides gras. L'acide octanoïque est par contre incapable de contracter la matrice, indiquant une trop forte solubilité ou mobilité de chaînes acide gras. Dans ce cas le lipide est probablement en équilibre
20 entre la matrice et le milieu environnant.

Pour mieux comprendre ces résultats nous avons travaillé avec des matrices amphiphiles submicroniques préparés selon l'exemple 7. Quatre types de matrices ont été préparées en utilisant quatre lipides anioniques différents (DPPG, palmitate de sodium, octanoate de sodium et dodécyl sulfate de sodium). Les quatre matrices ont été
25 préparées à un taux de neutralisation de 20 %. Les quatre lipides ont été préalablement additionnés d'une sonde fluorescente lipophile (diphenyl hexatriène ou DPH, Molecular Probes, Pays Bas).

Les quatre suspensions de matrices hydrophiles présentent des caractéristiques semblables (taille autour de 100 nm et Potentiel Z autour de 15 mV). Nous avons alors mesuré l'émission de fluorescence (Spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS 50B) dans les quatre cas en eau et en milieu salin physiologique (PBS). Le Tableau II montre
5 clairement que dans le cas du DPPG et du palmitate le niveau de fluorescence est similaire en eau et en PBS, indiquant une bonne stabilité des lipides à l'intérieur de la matrice. Pour l'octanoate et dodecyl sulfate, la fluorescence en eau indique un chargement de la matrice en lipide mais cette fluorescence disparaît complètement en milieu ionique, indiquant une fuite complète du lipide.

10

Tableau II. Etude de l'émission de fluorescence de différentes matrices amphiphiles cationiques en eau ou en PBS en fonction du contre ion lipidique.

| <i>Contre ion</i> | <i>Fluorescence en eau (UA)</i> | <i>Fluorescence en PBS (UA)</i> |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| DPPG | 425 | 395 |
| Palmitate | 350 | 340 |
| Octanoate | 250 | 0 |
| Dodecyl sulfate | 300 | 0 |

On peut conclure de cette étude que des lipides trop solubles ou en tout cas des
15 tensioactifs présentant une solubilité dans l'eau supérieure à celle du sodium dodécyl sulfate ne pourront pas former à eux tous seuls des matrices amphiphiles stables.

Dans les deux cas où la matrice amphiphile semble stable (DPPG et palmitate) nous avons réalisé une étude de polarisation de la fluorescence du DPH en fonction de la température. En effet, le DPH permet de déterminer la température de transition de
20 lipides car sa position dans les phases lipidiques est différente en fonction de l'état de fluidité de la membrane. La figure 4 représente l'évolution de la fluorescence des deux types de matrices en fonction de la température en milieu aqueux. On observe pour le DPPG une température de transition autour de 45 °C, indiquant que les phospholipides se sont organisés à l'intérieur de la matrice sous une forme lamellaire présentant les
25 mêmes caractéristiques de coopérativité que les formes liposomales. L'acide palmitique par contre ne présente pas de température de transition, la diminution

progressive de la fluorescence s'explique par l'augmentation progressive de la fluidité de la phase lipidique.

5 Finalement nous avons réalisé une étude de la taille des particules obtenues en fonction du taux de neutralisation des matrices lipidiques submicroniques chargées en DPPG. Nous avons observé que pour des taux de neutralisation supérieures à 60 % de la charge, on commence à observer des phénomènes d'agrégation dus à une trop grande hydrophobie des matrices. Ce phénomène a été également observé pour d'autres lipides, et dépend non pas de la charge lipidique mais du taux de neutralisation de la matrice, indiquant que le caractère ionique doit être maintenu pour préparer des
10 matrices amphiphiles stables en suspension.

Exemple 8: Préparation de matrices amphiphiles anioniques de taille submicronique avec des lipides cationiques

15 10 ml d'une solution de matrices anioniques (3 g/l, 30 mg) préparées selon l'exemple 5 sont placées à 80°C. On additionne progressivement 200 µl d'une solution éthanolique de dioctadécyl diméthyl ammonium (30 g /l, 6 mg, Sigma, USA). Après addition du lipide, la suspension est incubée à 80°C pendant 30 minutes puis laissée refroidir à température ambiante. L'éthanol est ensuite éliminé par ultrafiltration sur membrane de 30 Kda.

20 On obtient une suspension de matrices amphiphiles anioniques à 5 g/l présentant les caractéristiques suivantes :

Taille : 230 nm (S.D. 90 nm)

Charge lipidique 20 % w/w

Potentiel Z (Tampon phosphate 15 mM pH 7): - 14 mV

25

Exemple 9: Solubilisation et stabilisation de l'Amphotéricine B dans des matrices amphiphiles cationiques.

30 L'amphotéricine B est un antifongique extrêmement insoluble qui ne possède pas de charge à pH physiologique . On peut néanmoins considérer que c'est un exemple de composé insoluble de charge opposée à la matrice car la fonction COOH peut être polarisée par son interaction avec la matrice.

10 ml d'une solution de vecteurs amphiphiles de l'exemple 6 à 5 g/l (50 mg) est maintenue sous agitation dans un bain-marie à 50°C. On ajoute 500 µl d'une solution d'Amphotéricine B à 20 g/l en diméthyl sulfoxyde (DMSO) sont ajoutés à la solution de vecteurs amphiphiles. La suspension résultante est laissée sous agitation à 50°C
5 durant 2 heures. On observe la complète dissolution de l'Amphotéricine B.

La suspension de particules obtenues est filtrée sur 0,2 µm et le taux d'association de l'Amphotéricine B aux vecteurs amphiphiles est mesuré par spectroscopie (absorption à 405 nm). Le taux d'association est supérieur à 90% en eau.

10 1 ml de suspension de particules amphiphiles chargées est ensuite dilué avec 9 ml de tampon PBS et le taux d'association est mesuré de la même façon. Le taux d'association en PBS reste supérieur à 80 %.

Exemple 10: Incorporation et stabilisation d'un composé très hydrophobe dans des
15 matrices submicroniques amphiphiles cationiques.

Le valérate d'estradiol est un dérivé de l'estradiol extrêmement hydrophobe.

8,9 mg d'estradiol valérate sont solubilisés dans 5 ml d'une solution éthanolique de DPPG à 16 g/l préparé suivant l'exemple 1.

Suivant le procédé décrit dans l'exemple 6, on injecte 2,8 ml de solution de
20 DPPG-estradiol (45 mg DPPG, 5 mg d'estradiol valérate) dans 20 ml d'une suspension de matrices hydrophiles cationique préparée selon l'exemple 3 (3,5 g/l, 70 mg).

Après dialyse à 37°C contre de l'eau on obtient une suspension translucide de matrices amphiphiles chargées en estradiol valérate présentant les caractéristiques suivantes :

25 Taille : 100-150 nm

Potentiel Z (tampon phosphate 15 mM pH 7) = +11 mV

Taux d'association en eau (HPLC) : > 90 %

Taux d'association en PBS (HPLC) : > 80 %

30 Exemple 11 Incorporation d'un lipide neutre avec le lipide chargé dans la matrice amphiphile.

Une solution éthanolique DPPG / cholestérol : 70/30 (w/w) à 20 g/l est préparée en partant d'une solution éthanolique de DPPG à 16 g/l préparée selon l'exemple 1.

5 Cette solution éthanolique de DPPG / cholestérol (1 ml, 20 mg) est injectée à chaud dans 10 ml d'une solution de vecteurs cationiques submicroniques préparés selon l'exemple 3 à 3 g/l (30 mg) qui est maintenue à 80°C. Le taux de lipides est de 65% w/w (45 % DPPG, 20% Cholestérol) par rapport aux vecteurs.

La suspension est maintenue 30 minutes à 80°C puis on la laisse revenir à température ambiante. On obtient une suspension de matrices amphiphiles cationiques submicroniques à 5 g/l présentant les caractéristiques suivantes :

Taille : 90 nm (SD 30 nm)

Taux d'association cholestérol : 100 %

Potentiel Z (tampon phosphate 15 mM, pH 7) : + 15 mV.

15 Exemple 12: Préparation de matrices amphiphiles cationiques submicroniques à partir de polymères naturels cationisés non réticulés.

Dans cet exemple, les polymères naturels étudiés sont l'amylose (polysaccharide de type linéaire) et l'amylopectine (polysaccharide de type ramifié). Les deux polymères présentent des masses molaires très élevées.

20 Les deux polysaccharides sont cationisés selon la méthode décrite dans l'exemple 2 sans ajouter d'épichlorhydrine. Ils sont traités avec du GTMA dans les mêmes conditions de façon à obtenir des polymères cationisés présentant un taux de charge de 1,7 mmol / g en fonctions ammonium quaternaire.

Les matrices amphiphiles cationiques non réticulées sont alors préparées 25 suivant la même méthodologie que l'exemple 7. La taille de ces matrices est étudiée en fonction du taux de phospholipides anioniques (DPPG, Figure 5).

On observe d'abord une compaction des molécules de polymère cationique, due probablement à l'interaction hydrophobe entre les chaînes d'acides gras. Cette compaction produit spontanément des matrices amphiphiles de taille voisine de 200 30 nm. Dans la cas de l'amylopectine on observe que ces matrices se forment à partir de 5% de neutralisation (6 % DPPG w/w) et restent dans la même gamme de tailles jusqu'à 60 % (80 % DPPG w/w) de neutralisation, valeur à partir de laquelle

l'agrégation augmente fortement. Dans le cas de l'amylose, l'agrégation est progressive à partir de 5 % de neutralisation. Il semble que des polymères ramifiés forment des matrices amphiphiles mieux structurés probablement du à une forme naturellement plus globulaire de la molécule.

- 5 Les matrices amphiphiles obtenue à partir de l'amylopectine cationisée présentent donc une taille autour de 200 nm et sont stables lorsqu'elles sont placées en milieu salin (PBS).

10 Exemple 13: Incorporation de l'Amphotéricine B dans des matrices amphiphiles non réticulées.

L'incorporation est réalisée suivant la méthode de l'exemple 8 à partir de matrices amphiphiles non réticulées de l'exemple 12. Les matrices amphiphiles utilisées ont été réalisées à un taux de DPPG de 40 % w/w.

- 15 Le taux de solubilisation de l'Amphotéricine B (AmB) est étudié en fonction du type de matrice amphiphile non réticulée. Le taux de solubilisation de l'Amphotéricine B dans l'eau présente peu de différences avec les matrices amphiphiles classiques déjà décrites mais la stabilité de l'association en PBS montre des fortes différences (Figure 6).

- 20 On observe que pour de faibles concentrations en Amphotéricine, les deux types de matrices sont capables de stabiliser l'amphotéricine tout comme les matrices réticulées. Par contre, pour des taux plus élevés, seules les matrices obtenues à partir de l'amylopectine sont capables de maintenir l'amphotéricine en suspension, à un taux légèrement inférieur à celui des matrices réticulées.

REVENDICATIONS

- 1) Matrice polymérique caractérisée en ce qu'elle comporte une matrice hydrophile macromoléculaire portant une charge ionique positive ou négative et dans laquelle
5 est incorporée une phase lipidique de signe contraire à celui de la matrice.
- 2) Matrice polymérique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la matrice hydrophile est constituée de polymère linéaire ou ramifié dont la charge ionique est naturellement ou chimiquement greffée.
- 3) Matrice polymérique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la
10 matrice hydrophile est constituée de polymère polyhydroxylé linéaire ou ramifié dont la charge ionique est naturellement ou chimiquement greffée.
- 4) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la matrice hydrophile est constituée de polysaccharides ou oligosaccharides portant des fonctions ioniques naturellement ou chimiquement greffées.
- 15 5) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la matrice hydrophile est naturellement ou chimiquement réticulée.
- 6) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la charge est obtenue par greffage d'une charge ionique, portée par un groupement phosphate ou un groupement ammonium quaternaire.
- 20 7) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que les lipides chargés sont choisis parmi les phospholipides, les acides gras, les tensioactifs anioniques ou cationiques, les lipides anioniques ou cationiques.
- 8) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le
lipide anionique est choisi dans le groupe constitué des diacyl phosphatidyl
25 glycérol, diacyl phosphatidyl sérine, cardiolipine, acides gras.
- 9) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le lipide cationique est choisi dans le groupe constitué des diacyl diméthyl ammonium, acyltriméthylammonium, DOGS, DOTAP, phospholipides ou phosponolipides cationiques, acylcarnitine, esters de bétaïne à longue chaîne.
- 30 10) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la phase lipidique contient également des lipides neutres.

- 11) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'un film.
- 12) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'un « patch ».
- 5 13) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une particule.
- 14) Matrice polymérique selon la revendication 13, caractérisée en ce que la particule est une microparticule ou une nanoparticule.
- 15) Matrice polymérique selon la revendication 14, caractérisée en ce que la particule
10 est maintenue en suspension par addition de tensioactifs ou phospholipides non ioniques ou zwitterioniques.
- 16) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que, dans la matrice et/ou dans la phase lipidique, se trouve incorporé un principe actif.
- 17) Procédé de préparation d'une matrice polymérique selon l'une des revendications 1
15 à 16, caractérisé en ce que :
- a) On prépare une matrice polymérique hydrophile portant une charge globale positive ou négative.
 - b) On prépare une solution de lipides de charge opposée à celle de la matrice.
 - c) On effectue un mélange des deux solutions sous agitation, à une
20 température suffisante pour fluidifier la phase lipidique, afin de la faire pénétrer dans la matrice.
- 18) Procédé de préparation selon la revendication 17, caractérisé en ce que le mélange de l'étape c) s'effectue à une température comprise entre 40 et 80 °C.
- 19) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient une matrice
25 polymérique selon l'une des revendications 1 à 16, ou obtenue par un procédé selon la revendication 17 ou 18, dans laquelle est incorporé un principe actif et un support pharmaceutiquement acceptable pour son administration.
- 20) Composition cosmétologique, caractérisée en ce qu'elle contient une matrice
30 polymérique selon l'une des revendications 1 à 16, ou obtenue par un procédé selon la revendication 17 ou 18, dans laquelle est incorporé un principe actif à activité dermatologique et/ou cosmétique et des excipients cosmétologiquement acceptables.

- 21) Composition à usage alimentaire, caractérisée en ce qu'elle contient une matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 16, ou obtenue par un procédé selon la revendication 17 ou 18.
- 22) Matrice polymérique selon l'une des revendications 1 à 16, ou obtenue par un procédé selon la revendication 17 ou 18 à titre de médicament.
- 5

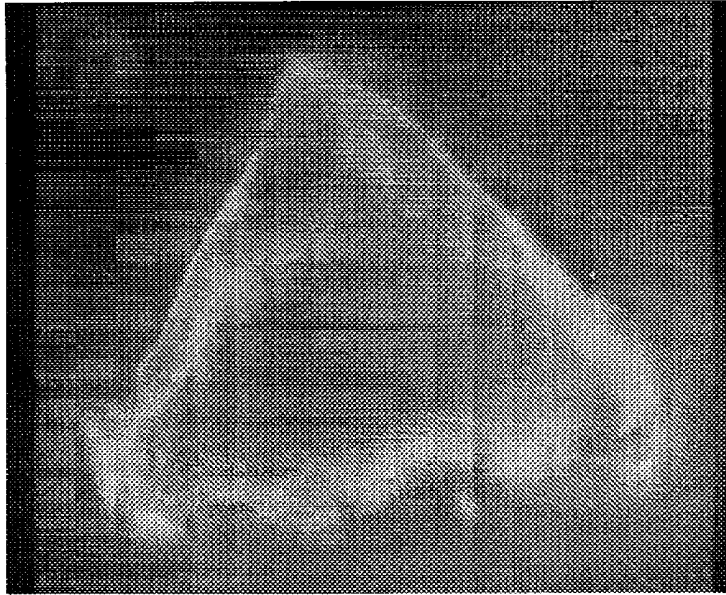


FIG. 1

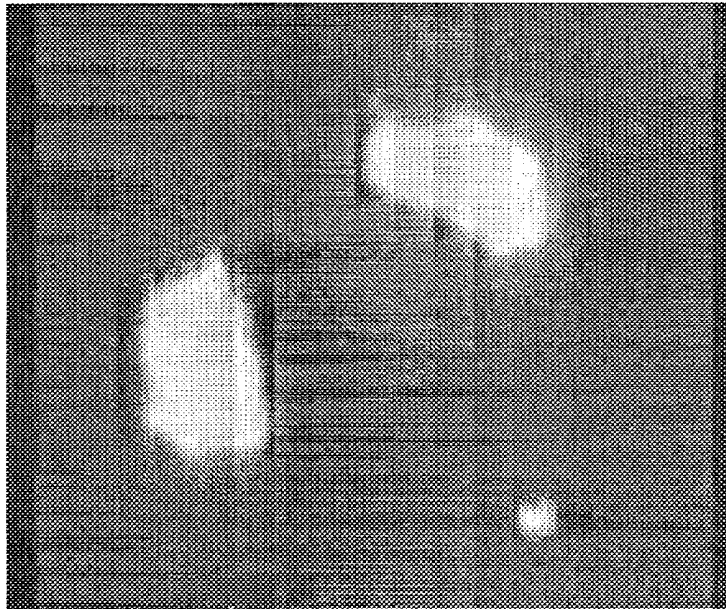


FIG. 2

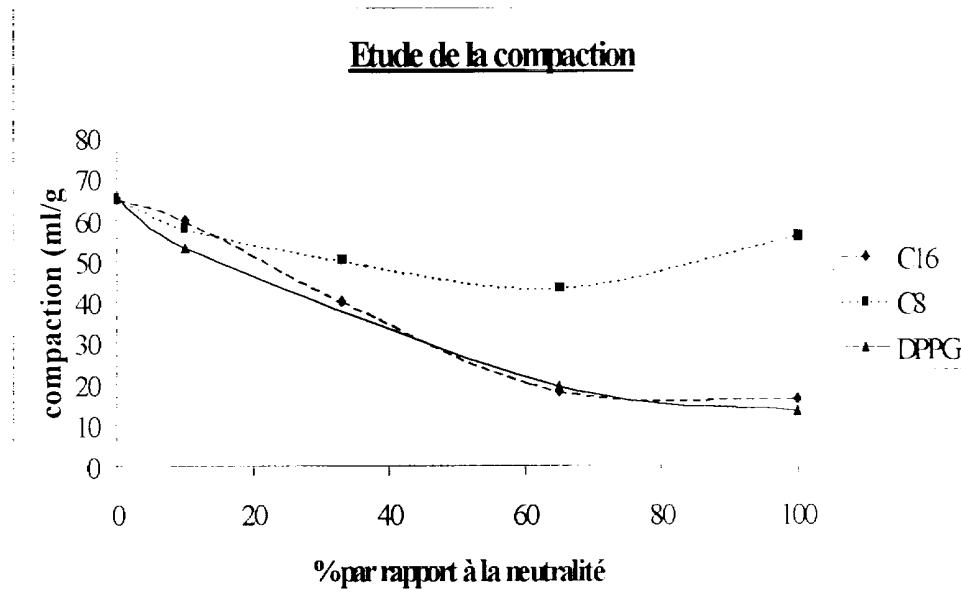


FIG.3

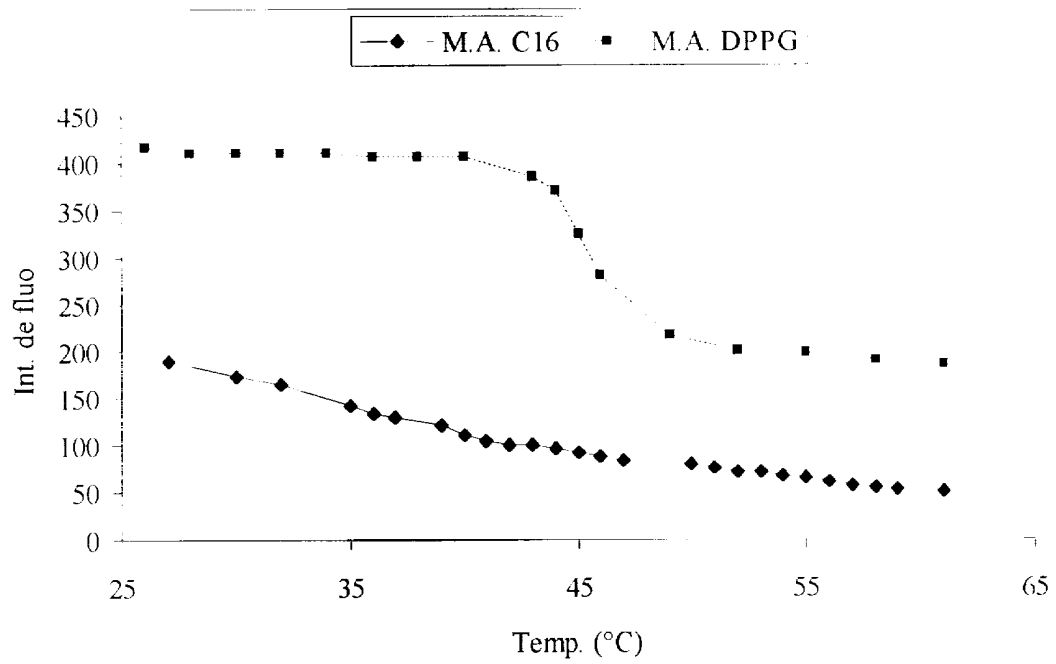


FIG.4

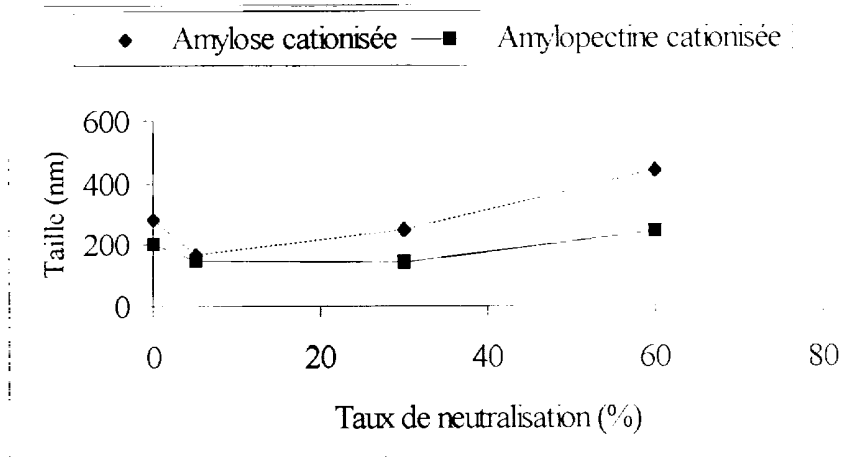


FIG. 5

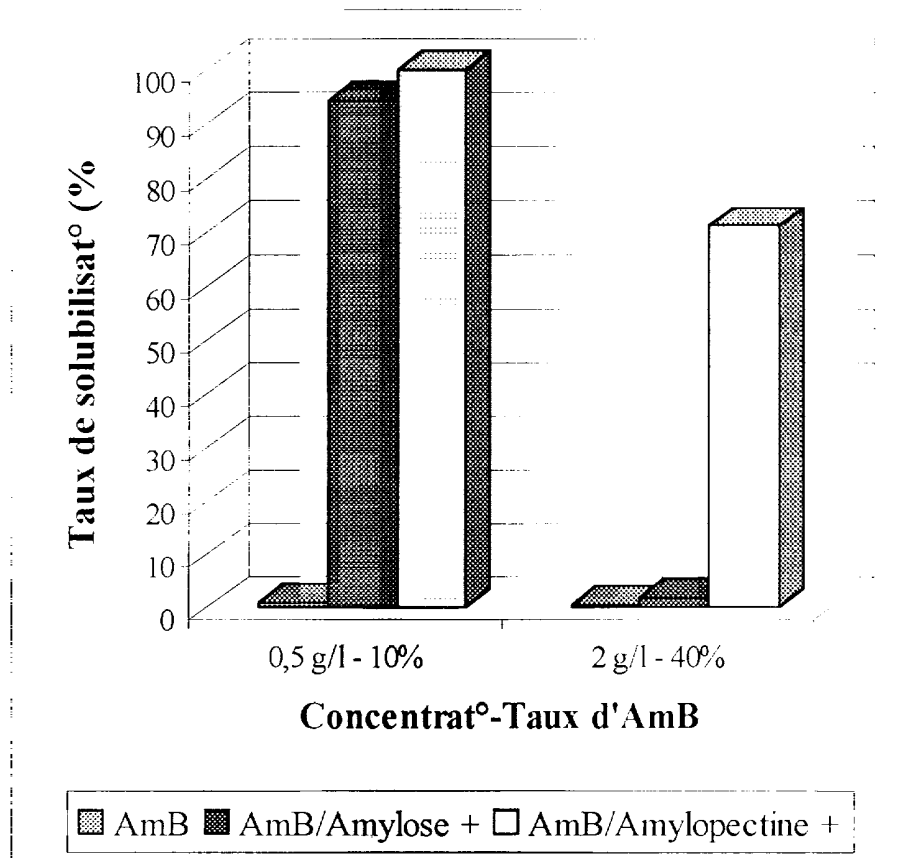


FIG.6

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | Revendications concernées | Classement attribué à l'invention par l'INPI |
|--|---|---------------------------------------|--|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | | |
| X | <p>MAJOR M ET AL: "Characterisation and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1327, no. 1, 1997, pages 32-40, XP000938309 ISSN: 0006-3002 * page 33, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite * * tableau 1 * * page 39, colonne de droite, dernier alinéa - page 40 *</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-10, 13-17, 19,21,22 | A61K47/36 A61K7/00 A61K9/00 A23L1/00 A61P31/10 A61P5/30 |
| X | <p>WO 98 56334 A (KABANOV VICTOR A ;KABANOV ALEXANDER V (US); EISENBERG ADI (US); UN) 17 décembre 1998 (1998-12-17)</p> <p>* page 3, ligne 12 - ligne 31 * * page 12, ligne 6 - page 21, ligne 36 * * page 28, ligne 22 - ligne 35 * * exemples * * revendications *</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-3, 7-10, 13-17, 19,21,22 | <p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)</p> <p>A61K</p> |
| X | <p>LEE ROBERT J ET AL: "Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 14, 1996, pages 8481-8487, XP002016042 ISSN: 0021-9258 * page 8482, colonne de gauche, alinéa 2 * * page 8482, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 2 * * figure 9 * * page 8487, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite *</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1,2,7,8, 10, 13-17, 19,21,22 | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur: | |
| 21 septembre 2000 | | Epskamp, S | |
| <p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p> | | | |

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | Revendications concernées | Classement attribué à l'invention par l'INPI |
|---|---|---|--|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | | |
| X | FR 2 766 706 A (BIOVECTOR THERAPEUTICS) 5 février 1999 (1999-02-05) * page 7, ligne 7 - page 10, ligne 19 * * page 14, ligne 19 - page 15 * * figure 2; exemples 1-4,7,8 * * revendications 1-10,19 * --- | 1-4,7,8, 10, 13-19, 21,22 | |
| A | FR 2 757 768 A (BIOVECTOR THERAPEUTICS SA) 3 juillet 1998 (1998-07-03) * page 2, ligne 22 - ligne 32 * * exemples 1,2 * * revendication 1 * ----- | 1-22 | |
| | | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) |
| | | Date d'achèvement de la recherche | Examineur |
| | | 21 septembre 2000 | Epskamp, S |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES | | | |
| X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire | | T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant | |

1

EPO FORM 1503 12.98 (P04C35)

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 581752
FR 0000329

Bien que les revendication 22 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés à la composition.