

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 janvier 2009 (08.01.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/004214 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 9/51 (2006.01)

(74) Mandataire : LE COUPANEC, Pascale; Nony & Asso-
cies, 3 rue de Penthièvre, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2008/051043

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

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

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0755662 11 juin 2007 (11.06.2007) FR

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

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

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

Publiée :

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

(54) Title: METHOD FOR PREPARING LIPID NANOPARTICLES

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION DE NANOPARTICULES LIPIDIQUES

(57) Abstract: The present invention relates to a method for use in the preparation of nanocapsules which have a liquid lipid core and a solid lipid shell and which are loaded with at least one active agent, wherein said method comprises at least the steps consisting in providing a microemulsion formulated by phase inversion of an emulsion, providing a second composition, distinct from said microemulsion and completely or partly formed from at least one active agent, placing said microemulsion in the presence of said second composition under conditions suitable for the interaction of said active agent with said microemulsion and annealing said microemulsion having interacted with said active agent in such a way as to obtain said nanocapsules. The invention also relates to a corresponding kit.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé utile pour la préparation de nanocapsules à cœur lipidique liquide, écorce lipidique solide et chargées en au moins un actif, ledit procédé comprenant au moins les étapes consistant à disposer d'une microémulsion formulée par inversion de phase d'une émulsion, disposer d'une seconde composition, distincte de ladite microémulsion et formée en tout ou partie d'au moins un actif, mettre en présence ladite microémulsion avec ladite seconde composition dans des conditions propices à l'interaction dudit actif avec ladite microémulsion et effectuer la trempe de ladite microémulsion ayant interagi avec ledit actif de manière à obtenir lesdites nanocapsules. L'invention vise en outre un kit correspondant.

WO 2009/004214 A2

Procédé de préparation de nanoparticules lipidiques

La présente invention vise à proposer un kit utile pour préparer de manière extemporanée des nanocapsules lipidiques chargées en au moins un actif et vise en outre à proposer un procédé utile pour préparer de telles nanocapsules.

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

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

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

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

30 Par ailleurs, les inventeurs ont également décrit dans le brevet EP 1 265 698 à titre de véhicule d'actifs liposolubles ou lipodispersibles, des nanocapsules à cœur liquide et écorce solide de nature lipidique et une technologie originale permettant d'y accéder.

Plus précisément, ces nanocapsules chargées en actifs liposolubles ou lipodispersibles sont obtenues à partir d'une microémulsion, cette microémulsion étant préparée par la technique d'inversion de phase par effet thermique (émulsion PIT).

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

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

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

Ainsi, l'homme de l'art ne dispose pas d'une méthode simple de mise en œuvre et rapide pour accéder à des nanocapsules chargées en actifs. Par ailleurs, un tel procédé n'autorise pas la mise en œuvre d'actifs thermosensibles.

La présente invention vise précisément à proposer un nouveau procédé permettant de suppléer aux inconvénients précités.

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

- disposer d'une microémulsion, et donc à un état non solide, formulée ou encore formée par inversion de phase d'une émulsion et stabilisée par au moins un système tensioactif contenant au moins un tensioactif thermosensible, non ionique et hydrophile et le cas échéant un tensioactif lipophile.

5 - disposer d'une seconde composition, distincte de ladite microémulsion et formée en tout ou partie d'au moins un actif,

- mettre en présence ladite microémulsion avec ladite seconde composition dans des conditions propices à l'interaction dudit actif avec ladite microémulsion, et

10 - effectuer la trempe de ladite microémulsion ayant interagi avec ledit actif de manière à obtenir des nanocapsules comprenant ledit actif et formées d'un cœur lipidique liquide à température ambiante, enrobé d'un film lipidique solide à température ambiante.

15 Selon un autre de ses aspects, la présente invention vise à protéger un kit utile pour la préparation de nanocapsules à cœur lipidique liquide, écorce lipidique solide et chargées en au moins un actif, notamment hydrosoluble, hydrodispersible, liposoluble ou lipodispersible, ledit kit comprenant au moins :

20 - une première composition comprenant au moins une phase grasse huileuse, une phase aqueuse et un système tensioactif comprenant au moins un tensioactif thermosensible, hydrophile et non ionique et, le cas échéant un tensioactif lipophile, ladite première composition se présentant sous la forme d'une microémulsion formée par inversion de phase d'une émulsion, et

25 - une seconde composition, séparée de la première composition, comprenant au moins un actif, notamment hydrosoluble, hydrodispersible, liposoluble ou lipodispersible.

Un système tensioactif convenant notamment à un kit de l'invention est plus particulièrement décrit ci-après.

30 Un tel kit est notamment avantageux dans la mesure où il offre à son utilisateur la possibilité de produire de manière extemporanée et simplifiée des nanocapsules chargées en au moins un actif.

Selon une variante de réalisation, ledit kit peut contenir plusieurs secondes compositions se différenciant les unes des autres au moins par la nature de l'actif qu'elles contiennent.

5 La présente invention, selon encore un autre de ses aspects, vise l'utilisation d'un kit conforme à l'invention pour préparer de manière extemporanée des nanocapsules à cœur lipidique liquide, écorce lipidique solide et chargées en au moins un actif.

10 La présente invention résulte plus particulièrement de l'observation par les inventeurs que, contre tout attente, une microémulsion obtenue par inversion de phase d'une émulsion, en particulier selon la technique inversion de phase en température, s'avère dotée d'une aptitude à interagir avec un actif de manière à, soit, l'encapsuler à l'intérieur de ces nanogouttelettes de phase huileuse, soit, l'adsorber au niveau de l'écorce lipidique de ces gouttelettes. De manière surprenante cette interaction n'affecte pas la

15

Microémulsion

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

Comme précisé précédemment, la microémulsion peut comprendre au moins une phase grasse huileuse, une phase aqueuse et un système tensioactif comprenant au moins un tensioactif thermosensible, hydrophile et non ionique et de préférence en association avec au moins un tensioactif lipophile.

30

a - Phase grasse huileuse

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

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

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

D'autres triglycérides d'intérêt sont composés principalement d'acides gras de longueurs moyennes encore appelés triglycérides à chaîne moyenne (MCT). Une huile à 15 triglycérides à chaîne moyenne (MCT) est un triglycéride dans lequel la chaîne carbohydate a de 8 à 12 atomes de carbone.

De telles huiles MCT sont disponibles commercialement.

A titre d'exemple de ces huiles MCT, on peut citer les TCR (nom commercial de la société industrielle des oléagineux, France, pour un mélange de triglycérides dans 20 lequel environ 95 % des chaînes d'acides gras possèdent 8 ou 10 atomes de carbone) et le Myglyol[®] 812 (triglycéride commercialisé par la société Dynamit Nobel, Suède pour un mélange de triesters de glycérides d'acide caprylique et caprique).

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

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

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

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

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

b - Système tensio-actif

5 Ce système tensioactif comprend au moins un tensioactif thermosensible, hydrophile et non ionique.

Le tensioactif, thermosensible, hydrophile et non ionique, mis en œuvre selon la présente invention est avantageusement un tensioactif hydrophile amphiphile.

10 Les tensioactifs émulsionnants habituellement utilisés ont un HLB (HLB = Hydrophilic Lipophilic Balance) allant de 8 à 18. Ces émulsionnants, grâce à leur structure amphiphile, se placent à l'interface phase huileuse / phase aqueuse, et stabilisent ainsi les gouttelettes d'huile dispersées.

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

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

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

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

Ces tensioactifs peuvent également être soit des composés naturels à l'image des phospholipides écholates ou des composés synthétiques tels que les polysorbates qui sont des esters d'acide gras de sorbitol polyéthoxylé (Tween[®]), les esters de polyéthylène glycol d'acide gras provenant par exemple de l'huile de ricin (Crémophor[®]), des acides gras polyéthoxylés, par exemple de l'acide stéarique (Simulsol M-53[®]), des éthers d'alcool gras polyoxyéthylénés (Brij[®]), des éthers non phényles polyoxyéthylénés (Triton N[®]), des éthers hydroxylphényle polyoxyéthylénés (Triton X[®]).

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

Selon un mode de réalisation préféré, ledit système tensioactif peut avantageusement comprendre en outre au moins un tensioactif lipophile.

Avantageusement, le tensioactif lipophile est solide à température ambiante.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pour sa part, la phase aqueuse de la microémulsion peut également avantageusement contenir de 1 à 4 % d'un sel notamment inorganique comme par exemple

le chlorure de sodium. En effet, la modification de la concentration en sel entraîne un déplacement de la zone d'inversion de phase. Ainsi, plus la concentration en sel augmente et plus la température d'inversion de phase est basse. Ce phénomène s'avère tout particulièrement intéressant pour l'encapsulation de principes actifs thermosensibles hydrophobes.

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

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

Dans un mode de réalisation préféré, la phase grasse est un triglycéride d'acide gras, le tensio-actif lipophile est une lécithine et le tensio-actif hydrophile est le Solutol[®] HS15.

Une microémulsion convenant à l'invention peut notamment être accessible selon la technique d'inversion de phase, en particulier par une opération d'inversion de phase en température à partir d'une émulsion, stabilisée par le système tensioactif considéré pour la microémulsion.

Une microémulsion convenant tout particulièrement à l'invention est accessible par une opération d'inversion de phase en température à partir d'une émulsion huile-dans-eau.

Cette seule opération d'inversion de phase en température, nécessaire pour obtenir la microémulsion de départ, peut être unique ou répétée.

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

Ainsi, l'ensemble des constituants destinés à former la microémulsion est pesé dans un récipient. Le mélange est homogénéisé, par exemple au moyen d'un Rayneri 350 tours/min, et chauffé en augmentant progressivement la température au moyen d'un bain-marie jusqu'à une température supérieure ou égale à la température d'inversion de phase T_2 , c'est-à-dire jusqu'à l'obtention d'une phase blanche plus visqueuse qui indique l'obtention de l'émulsion inverse. Le chauffage est alors stoppé et l'agitation maintenue

jusqu'à retour à la température ambiante, en passant par la température d'inversion de phase T_1 , c'est-à-dire la température à laquelle se forme la microémulsion attendue, sous la forme d'une phase transparente ou translucide. Lorsque la température est redescendue en dessous de la zone d'inversion de Phase en Température (T_1), on obtient à nouveau l'émulsion de départ.

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

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

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

Actif

Au sens de l'invention, l'expression « chargées en un actif » signifie que les nanocapsules obtenues à l'issue du procédé selon l'invention, comprennent au moins un actif encapsulé ou incorporé au niveau de leur cœur lipidique liquide et/ou adsorbé au niveau de leur écorce lipidique solide.

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

L'actif peut être hydrosoluble, hydrodispersible, liposoluble ou lipodispersible.

Selon une variante de réalisation, l'actif est hydrosoluble ou hydrodispersible. Il est alors de manière privilégiée, adsorbé au niveau de l'écorce lipidique solide des nanocapsules.

5 Selon une autre variante, l'actif peut être liposoluble ou lipodispersible. Dans un tel cas, il est préférentiellement incorporé au niveau du cœur des nanocapsules.

Selon encore une autre variante, l'actif peut être hydrosoluble ou hydrodispersible et être incorporé sous la forme d'entités micellaires inverses dispersées dans le cœur lipidique des nanocapsules.

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

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

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

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

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

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

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

5 Dans le cas, d'un chargement d'une nanocapsule en plusieurs actifs, ces derniers peuvent être mis en œuvre dans le procédé selon l'invention via des deuxièmes compositions qui leur sont spécifiques ou non.

Ces différentes deuxièmes compositions peuvent en outre être mises en œuvre à des stades différents ou non de variantes du procédé selon l'invention.

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

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

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

20 A titre illustratif et non limitatif des actifs hydrosolubles ou hydrodispersibles pouvant être encapsulés selon l'invention, on peut notamment citer le 5-Fluoro-uracile, la gemcitabine, la doxorubicine et leurs sels d'addition à un acide pharmaceutiquement acceptable et plus particulièrement le chlorhydrate, et les héparines de bas poids moléculaire.

25 A titre illustratif et non limitatif des actifs liposolubles ou lipodispersibles pouvant être encapsulés selon l'invention, on peut notamment citer l'étoposide ou l'ibuprofène.

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

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

Selon l'invention, cet actif peut être formulé au sein d'une deuxième composition. Cette deuxième composition peut par exemple contenir cet actif sous une forme solubilisée, par exemple dans de l'eau ou un milieu aqueux lorsque l'actif est hydrosoluble ou hydrodispersible ou dans un corps gras liquide lorsque cet actif est liposoluble ou lipodispersible. Avantageusement, le corps gras liquide peut être de même nature ou à défaut être chimiquement compatible avec celui formant la microémulsion associée.

Cet actif peut être également formulé à un état sec. En quel cas, il forme en tant que telle la deuxième composition.

Comme précisé précédemment l'actif est mis en présence avec ladite microémulsion dans des conditions propices à leur interaction.

Procédé selon l'invention

Dans le procédé selon la présente invention, la microémulsion de départ n'est avantageusement pas chargée en actif.

La microémulsion ayant interagi avec le ou les actifs selon le procédé revendiqué subit consécutivement une trempe selon l'invention.

Cette étape destinée à former les nanocapsules selon l'invention consiste en un refroidissement brusque de la microémulsion à une température propice à la solidification des films interfaciaux composant la microémulsion. Cette température est généralement très inférieure à T₁. Le refroidissement est avantageusement réalisé sous agitation magnétique.

Par exemple, on peut effectuer la trempe de ladite microémulsion chargée en un ou plusieurs actifs à une température au moins 30 °C inférieure à la T_{IP} au moment du trempage.

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

L'organisation du système sous forme de nanocapsules après trempage se traduit visuellement par un changement d'aspect du système initial qui passe de blanc-transparent à blanc-translucide avec effet Tyndall (reflets bleutés). Ce changement se

produit à une température inférieure à la TIP. Cette température est située généralement entre 6 et 15 °C en dessous de la TIP.

Dans une variante de réalisation, le procédé selon l'invention peut comprendre en outre au moins une étape d'inversion de phase en température avantageusement provoquée par une montée et une descente en température imposées à la microémulsion.

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

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

Plus précisément, il est imposé successivement à la microémulsion considérée selon l'invention, chargée ou non en au moins un actif, et avant la trempe destinée à former les nanocapsules chargées en au moins un actif, au moins les étapes consistant à :

- augmenter sa température jusqu'à une température T_2 supérieure à sa température d'inversion de phase (TIP) pour obtenir une émulsion eau-dans-huile suivie d'une diminution de la température jusqu'à une température T_1 , $T_1 < \text{TIP} < T_2$ pour obtenir de nouveau une émulsion huile-dans-eau,

- le cas échéant, effectuer un ou plusieurs cycles de température autour de la zone d'inversion de phase entre T_1 et T_2 et

- stabiliser ledit système à une température située dans ou au proche voisinage de l'inversion de phase pour former une nouvelle microémulsion obtenue par inversion de phase.

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

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

Cette ou ces étape(s) d'inversion de phase en température peuvent être réalisées avant ou après la mise en contact de ladite microémulsion avec ladite seconde composition.

Plus particulièrement, la microémulsion de départ n'est pas formée *in situ*,
5 c'est-à-dire n'est pas formée en présence de la composition contenant l'actif.

Selon une variante de réalisation, la microémulsion de l'étape 1 peut subir préalablement à sa mise en contact avec ladite seconde composition au moins une étape d'inversion de phase en température telle que définie ci-dessus.

Selon une autre variante de réalisation la microémulsion de l'étape 1 peut subir
10 après avoir interagi avec ladite seconde composition, au moins une étape d'inversion de phase en température telle que définie ci-dessus.

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

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

Avantageusement, les nanocapsules obtenues selon l'invention possèdent une
20 taille moyenne inférieure à 150 nm, de préférence inférieure à 100 nm, de préférence encore inférieure à 50 nm. Ces tailles peuvent être déterminées par spectroscopie à corrélation de photons, microscopie électronique à balayage, microscopie électronique à transmission en mode cryoscopique. A titre illustratif, la figure 1 est une photographie
25 obtenue par MET représentant un échantillon de nanocapsules de taille d'environ 90 nm.

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

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

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

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

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

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

15 Figures :

- La figure 1 représente une photographie d'un échantillon de nanocapsules de tailles d'environ 90 nm, visualisé sous microscopie électronique à transmission (MET), après coloration au tétr oxyde d'osmium (mesure de la taille par diffusion de la lumière).
- La figure 2 représente le taux de chlorhydrate de doxorubicine libéré de
20 nanocapsules (pH 7,4 et à 37°C), en fonction du temps (jours). Le terme "NCL" y signifie "nanocapsule lipidique".

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

25

Exemple 1 : Préparation d'une microémulsion non chargées en actif

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

30 L'ensemble est réuni dans un même bêcher et placé sous agitation magnétique. Un chauffage est appliqué jusqu'à atteindre une température de 85 °C. Toujours sous agitation magnétique, on laisse refroidir le système jusqu'à une température de 60 °C. Ces

cycles thermiques (entre 85 °C et 60 °C) sont réalisés trois fois de façon à obtenir des microémulsions de mieux en mieux structurées. Le système est alors maintenu sous sa forme microémulsion en le stabilisant à une température comprise dans (ou au proche voisinage) de la Zone d'Inversion de Phase, en l'espèce 65 °C.

5

Exemple 2 : Préparation de nanocapsules chargées en actif à partir de la microémulsion de l'exemple 1

La formulation de la microémulsion obtenue par inversion de phase reste strictement identique à celle décrite précédemment. Dans cet exemple 2, 10 mg d'un actif lipophile anti-cancéreux (l'étoposide) sous forme de poudre est dissous dans le Labrafac (500 mg). La composition contenant l'actif (2 ml) est rajoutée à la microémulsion décrite dans l'exemple 1. Les nanocapsules sont finalisées par trempage dans de l'eau froide (5 °C).

Les nanocapsules chargées en principe actif sont séparées du milieu par centrifugation.

Un taux d'incorporation de 95 % en poids en actif est vérifié par une méthode HPLC adaptée. (Alf Lamprecht, Jean-Pierre Benoit, Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition, Journal of Controlled Release 112 (2006) 208–213).

20

Exemple 3 : Préparation de nanocapsules chargées en actif à partir de la microémulsion de l'exemple 1

La formulation des nanocapsules reste strictement identique à celle décrite dans l'exemple 1. Dans ce cas, 100 mg d'ibuprofène sont au préalable dissous dans les 504 mg de Labrafac. Cette préparation est mise en présence des autres constituants en tout début de formulation. Les nanocapsules chargées en principe actif sont séparées du milieu par centrifugation.

L'ibuprofène est dosé par une méthode HPLC selon le protocole décrit dans Alf Lamprecht *et al.*, Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment, International Journal of Pharmaceutics 278 (2004) 407–414. Il est vérifié un taux d'incorporation dans les nanocapsules de 96 %.

30

Exemple 4 : Préparation de nanocapsules chargées en actifs hydrophiles au préalable apprêtés dans des micelles inverses.

Des cristaux de fluorescéine de sodium sont incorporés sous chauffage à 50 °C et sous agitation dans un mélange de Labrafac contenant des micelles inverses de Span 80 (10 % masse/masse).

Après homogénéisation de cette suspension micellaire, 0,25 ml sont introduits dans le système décrit dans l'exemple 1 juste avant l'étape de trempage. Le système se trouve alors sous la forme d'une microémulsion obtenue par inversion de phase d'un système émulsionné par effet thermique. Un taux d'incorporation de 75 % de fluorescéine de sodium dans les particules finales est mesuré par spectroscopie de fluorescence.

Exemple 5 : Préparation de nanocapsules dont le cœur lipidique est chargé en un principe actif hydrodispersible.

L'actif, à savoir le chlorhydrate de doxorubicine, est au préalable apprêté dans des micelles inverses. Pour cela, on mélange 5 ml de micelles inverses (obtenues par mélange de 0,6 g de Span 80[®] avec 3 g de Labrafac[®] sous agitation par vortex) avec 2 mg de chlorhydrate de doxorubicine sous forme de poudre.

On laisse incuber le mélange précédemment obtenu pendant 30 minutes à une température de 70°C et sous agitation magnétique. On centrifuge ensuite le mélange précédent pendant 5 minutes (13400 tr/min) afin d'éliminer l'excès de chlorhydrate de doxorubicine non solubilisé.

On mélange 1,934 g de Solutol HS 15[®], 89 mg de chlorure de sodium, 846 mg de Labrafac WL 1349[®] lipophile et 2,055 g d'eau distillée, sous chauffage (90°C) en 5 minutes sous agitation (500 tr/min). Le mélange est ensuite lentement refroidi à 85°C.

On ajoute alors à ce mélange, 1ml de la suspension de micelles inverses incorporant le chlorhydrate de doxorubicine, préalablement obtenue, tout en augmentant la vitesse d'agitation (700 tr/min).

A 72°C, le mélange précédent est dilué avec 12,5 ml d'eau distillée.

Le même mode de réalisation est effectué en ajoutant, cette fois, 3 ml de micelles inverses incorporant le chlorhydrate de doxorubicine (au lieu de 1 ml).

Exemple 6 : Caractérisation physicochimique de nanocapsules chargées en chlorhydrate de doxorubicine

On a comparé les propriétés physicochimiques (taille, indice de polydispersité IPD et potentiel zêta PZ) de nanocapsules témoins comprenant respectivement 1 ml et 3 ml de micelles inverses non chargées en actif, avec des nanocapsules comprenant respectivement 1 ml et 3 ml de micelles inverses chargées avec du chlorhydrate de doxorubicine, obtenues selon l'exemple 5.

Les résultats sont présentés dans les tableaux I (nanocapsules témoins) et II (nanocapsules chargées en actif) qui suivent.

- L'Indice de Polydispersité (IPD) reflète la distribution de taille des nanocapsules. Un IPD faible ($\leq 0,15$) indique que les nanocapsules présentent une distribution de taille de type gaussienne, c'est-à-dire une taille resserrée autour d'une valeur de taille moyenne.

- Le potentiel zêta (PZ) indique la force de répulsion présente à la surface des nanocapsules et permet de prédire leur stabilité à long terme. Ainsi, si toutes les particules en suspension ont un potentiel zêta négatif ou positif important, elles tendent à se repousser mutuellement et ne peuvent se rassembler. En revanche, si leur potentiel zêta est faible, aucune force ne les empêche de se rassembler et ainsi d'être stables.

Tableau I : Nanocapsules témoin

Volume de micelles inverses (ml)	Taille (nm)	IPD	PZ (mV)
1	43,6 $\pm$ 0,7	0,04 $\pm$ 0,01	-4,6 $\pm$ 2,9
3	86,1 $\pm$ 2,2	0,08 $\pm$ 0,02	-8,8 $\pm$ 1

Tableau II : Nanocapsules chargées en chlorhydrate de doxorubicine

Volume de micelles inverses chargées en chlorhydrate de doxorubicine (ml)	Taille (nm)	IPD	PZ (mV)
1	43,5 $\pm$ 0,7	0,04 $\pm$ 0,01	-5,9 $\pm$ 0,6
3	94,8 $\pm$ 6,0	0,13 $\pm$ 0,05	-10,4 $\pm$ 1;2

Il ressort des tableaux I et II ci-dessus, que pour un même volume de micelles inverses ajouté, on n'observe pas de différences de tailles entre des nanocapsules contenant

des micelles inverses témoin et des micelles inverses chargées en chlorhydrate de doxorubicine, confirmant que l'actif est incorporé dans le cœur des nanocapsules conformes à la présente invention.

5 En outre dans les deux cas (nanocapsules témoin et nanocapsules chargées avec du chlorhydrate de doxorubicine), la valeur de l'indice de polydispersité est faible, à savoir inférieure à 0,15 et ainsi montre que la distribution des tailles des nanocapsules est étroite, c'est-à-dire resserrée autour d'une valeur de taille moyenne.

10 Enfin, d'une façon générale, les potentiels zêta mesurés sont faiblement négatifs et on n'observe pas de différence significative entre le potentiel zêta des nanocapsules contenant du chlorhydrate de doxorubicine et celles n'en contenant pas (témoin). Ces faibles valeurs de potentiel zêta confirment la stabilité de l'échantillon de nanocapsules obtenues, conformément au procédé de préparation selon la présente invention.

15 **Exemple 7 : Rendement d'encapsulation**

Le rendement d'encapsulation (en %) des nanocapsules obtenues selon l'exemple 5 a été calculé et les résultats sont présentés dans le tableau III qui suit.

20 Le rendement d'encapsulation (RE) correspond à la proportion de chlorhydrate de doxorubicine encapsulée dans les nanocapsules par rapport au chlorhydrate de doxorubicine total ajouté dans la formulation.

Plus précisément, ce rendement est calculé selon la formule suivante (DOX = Chlorhydrate de doxorubicine, dans ce qui suit):

RE (%) = (quantité de DOX dans les nanocapsules x 100) / (quantité de DOX dans les nanocapsules + quantité de DOX libre).

25 Le dosage du chlorhydrate de doxorubicine encapsulée est mesuré par spectrofluorimétrie, à l'aide d'un spectrophotomètre FLUOROSKAN ASCENT® de Thermo Fisher Scientific (Cergy-Pontoise, France) qui éclaire l'échantillon à une longueur d'onde d'excitation λ_1 ($\lambda_1 = 485$ nm) et qui mesure la densité optique à une longueur d'onde d'émission λ_2 ($\lambda_2 = 550$ nm).

Tableau III:

TAILLE DES NANOCAPSULES (nm)	RENDEMENT ENCAPSULATION (%)	ECART TYPE
45	37,3	5,87
90	54,0	7,86

D'après les résultats ci-dessus, le rendement d'encapsulation est dépendant de la taille de la nanocapsule. Pour une taille moyenne de 90 nm, plus de la moitié de chlorhydrate de doxorubicine est incorporé dans les nanocapsules obtenues selon le procédé de la présente invention.

Exemple 8 : Cinétique de libération

La vitesse de libération du chlorhydrate de doxorubicine a été mesurée afin d'évaluer la stabilité des nanocapsules obtenues à l'exemple 5.

La vitesse de libération du chlorhydrate de doxorubicine a été évaluée par dosage par spectrofluorimétrie du chlorhydrate de doxorubicine libéré à l'aide d'un spectrophotomètre FLUOROSKAN ASCENT[®] de Thermo Fisher Scientific (Cergy-Pontoise, France) qui éclaire l'échantillon à une longueur d'onde d'excitation λ_1 ($\lambda_1 = 485$ nm) et qui mesure la densité optique à une longueur d'onde d'émission λ_2 ($\lambda_2 = 550$ nm).

La figure 2 indique le pourcentage de libération de chlorhydrate de doxorubicine en fonction du temps (nanocapsules chargées à pH 7,4; 37°C).

Il ressort de la figure 2 que la dégradation des nanocapsules et donc la libération du chlorhydrate de doxorubicine à partir des nanocapsules est lente dans le temps. En effet, environ 70 % de chlorhydrate de doxorubicine est libéré des nanocapsules de taille de 45 nm au bout de 7 jours et environ 26 % de cet actif est libéré des nanocapsules de taille de 90 nm au bout de 7 jours.

Plus précisément, le profil de libération est différent selon la taille des nanocapsules: plus les nanocapsules sont grandes, plus le profil de la libération est lent et étalé dans le temps.

Une telle cinétique de libération démontre que les nanocapsules obtenues selon le procédé de préparation de la présente invention ont un profil de dégradation lent et sont stables.

Exemple 9 : Lyophilisation des nanocapsules

Les nanocapsules obtenues selon l'exemple 5 sont soumises à un procédé de lyophilisation classique, afin d'évaluer leur robustesse.

- 5 Le procédé de lyophilisation est effectué selon les méthodes bien connues de l'homme du métier, à l'aide d'un lyophilisateur LYOVAC-GP2 couplé à un cryothermostat UNISTAT 385. La lyophilisation est entièrement réalisée sous une pression de 0,01 mbar. Le système est maintenu à une température de -45°C pendant une heure et passe à une température de 15°C en 5 heures. Il est maintenu 2 heures à une température de 15°C et
- 10 passe à une température de 25°C en 2 heures.

Les résultats sont présentés dans le tableau IV qui suit:

Tableau IV

Volume des micelles inverses chargées en DOX (ml)	Avant Lyophilisation		Après lyophilisation	
	Taille (nm)	IPD	Taille (nm)	IPD
1	$43,5 \pm 0,7$	$0,04 \pm 0,01$	$51,0 \pm 4,4$	$0,2 \pm 0,04$
3	$94,8 \pm 6,0$	$0,13 \pm 0,05$	$129,4 \pm 23,7$	$0,19 \pm 0,02$

- 15 D'après les résultats indiqués dans le tableau IV, on observe une faible modification de la taille des nanocapsules avant et après lyophilisation, montrant ainsi la robustesse des nanocapsules obtenues par le procédé selon la présente invention. En particulier, l'indice de polydispersité reste correct après la lyophilisation, confirmant ainsi la stabilité des nanocapsules obtenues par le procédé selon la présente invention.

20

Ainsi, les caractéristiques physicochimiques des nanocapsules obtenues selon le procédé de préparation de la présente invention sont stables et présentent de bonnes propriétés de conservation.

REVENDICATIONS

1. Procédé utile pour la préparation de nanocapsules à cœur lipidique liquide, écorce lipidique solide et chargées en au moins un actif, ledit procédé comprenant au moins les étapes consistant à :
- disposer d'une microémulsion formulée par inversion de phase d'une émulsion et stabilisée par au moins un système tensioactif contenant au moins un tensioactif thermosensible, non ionique et hydrophile,
 - disposer d'une seconde composition, distincte de ladite microémulsion et formée en tout ou partie d'au moins un actif,
 - mettre en présence ladite microémulsion avec ladite seconde composition dans des conditions propices à l'interaction dudit actif avec ladite microémulsion, et
 - effectuer la trempe de ladite microémulsion ayant interagi avec ledit actif de manière à obtenir des nanocapsules comprenant ledit actif et étant formées d'un cœur lipidique, liquide à température ambiante et enrobé d'un film lipidique solide à température ambiante.
2. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel le système tensioactif contient en outre au moins un tensioactif liposoluble.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 comprenant en outre au moins une opération d'inversion de phase en température.
4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel la microémulsion de l'étape 1 subit préalablement à sa mise en contact avec ladite seconde composition au moins une opération d'inversion de phase en température.
5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, dans lequel la microémulsion, ayant interagi avec ladite seconde composition, subit au moins une opération d'inversion de phase en température.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, dans lequel ladite opération d'inversion de phase comprend au moins les étapes consistant à :
- augmenter la température de la microémulsion, chargée ou non en au moins un actif, jusqu'à une température T2 supérieure à sa température d'inversion de phase (TIP) pour obtenir une émulsion eau-dans-huile suivie d'une diminution de la

température jusqu'à une température T_1 , $T_1 < T_{IP} < T_2$ pour obtenir de nouveau une émulsion huile-dans-eau,

- le cas échéant, effectuer un ou plusieurs cycles de température autour de la zone d'inversion de phase entre T_1 et T_2 et

- 5 - stabiliser ledit système à une température située dans ou au proche voisinage de l'inversion de phase pour former une nouvelle microémulsion obtenue par inversion de phase.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite microémulsion est au préalable obtenue par inversion de phase en température
10 d'une émulsion huile-dans-eau stabilisée par ledit système tensioactif.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite microémulsion comprend une phase grasse huileuse formée d'au moins un corps gras liquide ou semi-liquide.

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

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la phase grasse huileuse comprend au moins un triglycéride à chaîne moyenne (MCT).

20 11. Procédé selon la revendication 8 ou 9, dans lequel l'ester d'acide gras est choisi parmi les esters d'acide gras en C_8 à C_{18} , et notamment en C_8 à C_{12} .

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 11, dans lequel le tensioactif lipophile est à base de phospholipides.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 12, dans lequel le
25 tensioactif lipophile est une lécithine dont la proportion en phosphatidylcholine est comprise entre 40 et 80 % en poids.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 13, dans lequel le rapport corps gras liquide/tensioactif(s) lipophile(s) varie de 1 à 15, notamment de 1,5 à 13 et plus particulièrement de 3 à 8.

30 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le tensioactif hydrophile possède un HLB allant de 10 à 18, et notamment de 10 à 16.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le tensioactif hydrophile est choisi parmi les alcools gras éthoxylés, les acides gras éthoxylés, les glycérides partiels d'acides gras éthoxylés, les triglycérides d'acides gras et leurs dérivés éthoxylés, et leurs mélanges.

5 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la microémulsion est formée d'au moins un triglycéride d'acide gras et d'un dérivé 2-hydroxystéarate de polyéthylène glycol, et le cas échéant d'une lécithine.

10 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les nanoparticules obtenues possèdent une épaisseur d'écorce solide variant de 2 à 10 nm.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'actif est incorporé au niveau de l'écorce des nanocapsules.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'actif est incorporé dans le cœur des nanocapsules.

15 21. Kit utile pour la préparation de nanocapsules à cœur lipidique liquide, écorce lipidique solide et chargées en au moins un actif, ledit kit comprenant au moins :

- une première composition comprenant au moins une phase grasse huileuse, une phase aqueuse et un système tensioactif comprenant au moins un tensioactif thermosensible, hydrophile et non ionique et, le cas échéant un tensioactif lipophile, ladite
20 première composition se présentant sous la forme d'une microémulsion, et
- une seconde composition, séparée de la première composition, comprenant au moins un actif.

22. Kit selon la revendication 21, dans lequel ledit système tensioactif est tel que défini en revendication 17.

25 23. Utilisation d'un kit tel que défini en revendication 21 ou 22, pour préparer de manière extemporanée des nanocapsules à cœur lipidique liquide, écorce lipidique solide et chargées en au moins un actif.

1/2

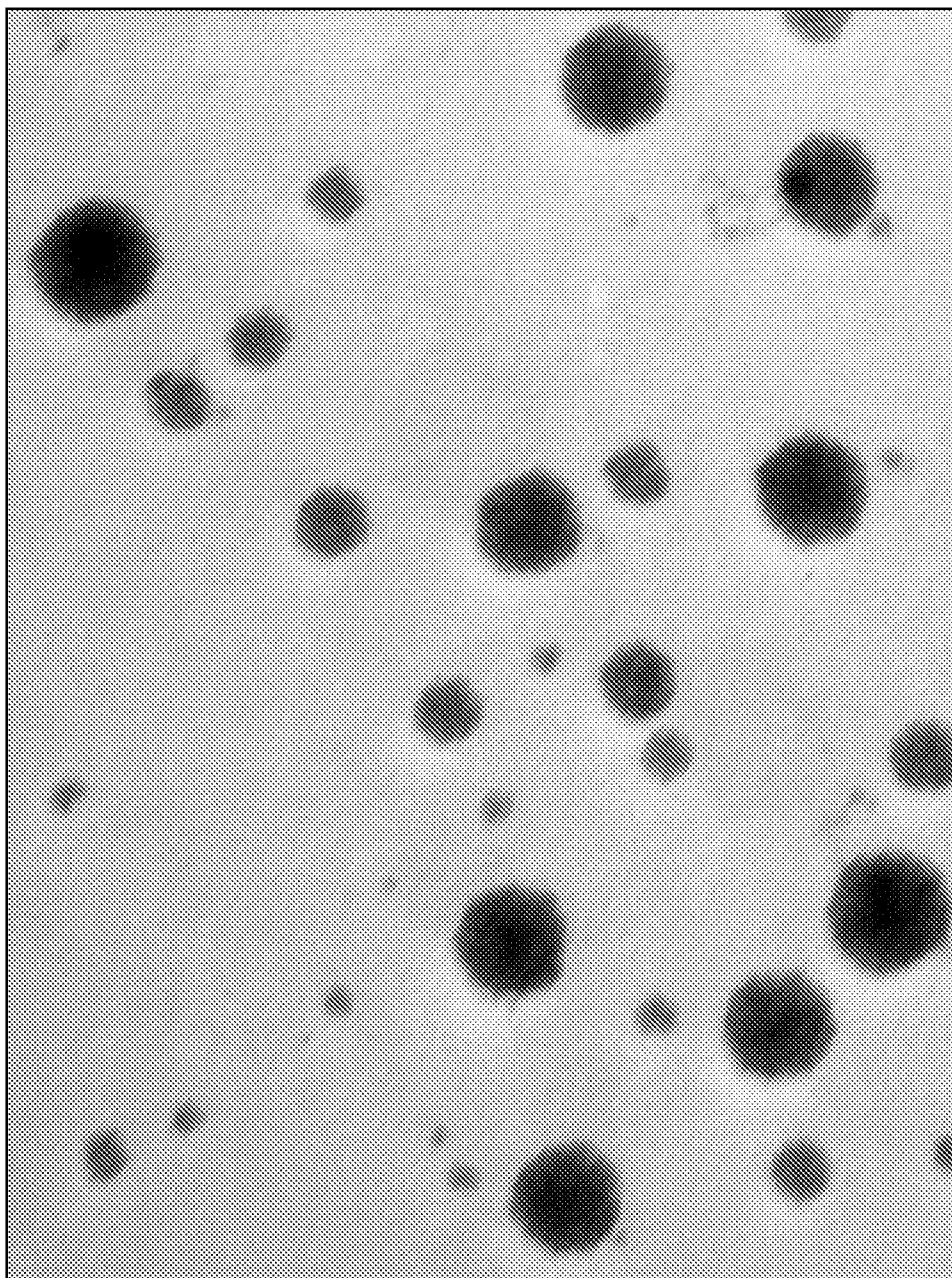
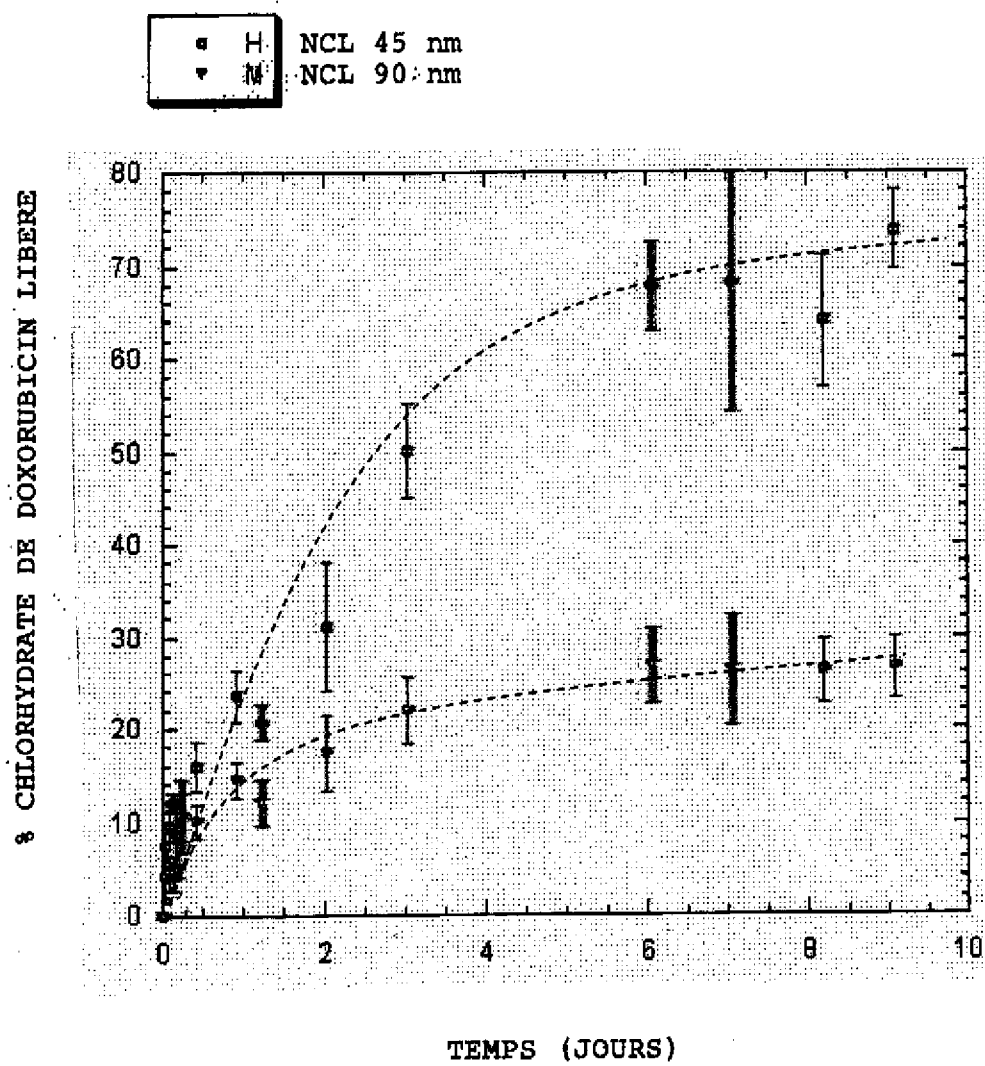


FIGURE 1

2/2

**FIGURE 2**