

(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
03 mai 2018 (03.05.2018)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/078045 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/107 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01) A61K 31/167 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2017/077506

(22) Date de dépôt international :

26 octobre 2017 (26.10.2017)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1660381 26 octobre 2016 (26.10.2016) FR

(71) Déposants : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR] ; 101, rue de Tolbiac, 75013 PARIS (FR). UNIVERSITE PARIS-SUD [FR/FR] ; 15, rue Georges Clémenceau, 91400 ORSAY (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR] ; 3, rue Michel Ange, 75016 PARIS (FR). UNIVERSITE PARIS DIDEROT PARIS 7 [FR/FR] ; 5, rue Thomas Mann, 75013 PARIS (FR). UNIVERSITE PARIS DESCARTES [FR/FR] ; 12, rue de l'Ecole de Médecine, 75006 PARIS (FR). ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE CHIMIE DE PARIS [FR/FR] ; 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 PARIS (FR).

(72) Inventeurs : ESPEAU, Philippe ; 120, Rue de Marolles, 94470 BOISSY SAINT LEGER (FR). CRAUSTE-MANCIET, Sylvie ; 24bis rue du Temple, 33000 BORDEAUX (FR). GHOSH, Vijayalakshmi ; Maison de l'Inde - 7R boulevard Jourdan, 75014 PARIS (FR). MICHEL, Laurence ; 7 rue des Batignolles, 75017 PARIS (FR). CORVIS, Yohann ; 1, Rue Michelet, 92150 SURESNES (FR). HUANG, Nicolas ; 37, Rue Traversière, 75012 PARIS (FR). LAZERGES, Mathieu ; 9 rue campagne première, 75014 PARIS (FR).

(74) Mandataire : REGIMBEAU ; 20, rue de Chazelles, 75847 PARIS CEDEX 17 (FR).

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

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

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title: TOPICAL EMULSIONS OF LIDOCAINE AND FATTY ACIDS USEFUL AS ANALGESIC, ANTALGIC OR SEXUAL RETARDANT

(54) Titre : EMULSIONS TOPIQUES DE LIDOCAÏNE ET D'ACIDES GRAS UTILES EN TANT QU'ANALGESIQUE, ANTALGIQUE OU RETARDANT SEXUEL

(57) Abstract: The present invention concerns an oil-in-water emulsion consisting of water and an oily phase consisting of lidocaine, a first fatty acid and a second fatty acid, the first fatty acid being lauric acid and/or tridecanoic acid, the second fatty acid being chosen from myristic acid, palmitic acid, stearic acid and oleic acid, and the mixtures of same. These emulsions can be used as medicine, in particular as an analgesic or antalgic in humans or animals, or as a sexual retardant. They can be incorporated into a pharmaceutical or veterinary composition, or into a medical device.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une émulsion huile-dans-eau constituée d'eau et d'une phase huileuse constituée de lidocaïne, d'un premier acide gras, d'un second acide gras, le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque, le second acide gras étant choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique, et leurs mélanges. Ces émulsions sont utiles en tant que médicament, notamment en tant qu'antalgésique, antalgique chez l'homme ou l'animal, ou retardant sexuel. Elles peuvent être incorporées dans une composition pharmaceutique ou vétérinaire, ou dans un dispositif médical.



WO 2018/078045 A1

EMULSIONS TOPIQUES DE LIDOCAÏNE ET D'ACIDES GRAS UTILES EN TANT QU'ANALGESIQUE, ANTALGIQUE OU RETARDANT SEXUEL

L'invention concerne des compositions comprenant une émulsion utile pour l'anesthésie locale topique, l'antalgie locale topique ou en tant que retardant sexuel.

Les crèmes anesthésiantes sont appliquées sur la peau avant une prise de sang, une piqûre ou en dermatologie avant un acte de chirurgie ou de laser. Deux médicaments disponibles actuellement en France sont l'EMLA[®] et son générique, l'anesderm[®].

La crème EMLA[®], utilisée actuellement pour les anesthésies locales topiques, notamment chez le nourrisson, présente également un effet antalgique (*i.e.* atténuation de la douleur) (Archives de Pédiatrie, 2004, 11, 921 -925).

L'EMLA[®] est une émulsion dont la phase huileuse inclut un mélange eutectique liquide de deux anesthésiques 1/1 en masse (EMLA[®] : Eutectic Mixture of Liquid Anesthetic) : la lidocaïne (CAS 137-58-6) et la prilocaïne (CAS 721-50-6). Le mélange eutectique de la phase huileuse de l'EMLA[®] est liquide à température ambiante, alors que la lidocaïne pure et la prilocaïne pure sont solides à cette température. Cette caractéristique résulte d'un effet physique qui ne modifie pas la nature chimique des constituants du mélange : l'effet eutectique, qui est un abaissement de la température de fusion mutuelle de composés dans un mélange. La délivrance du principe actif de la crème EMLA[®] est obtenue par diffusion des anesthésiques contenus dans la phase huileuse de l'EMLA[®] à travers le *Stratum Corneum*, qui est la barrière physiologique principale de la peau humaine.

L'EMLA[®] présente cependant un effet indésirable causé par la prilocaïne : elle peut provoquer des méthémoglobinémies, en particulier chez les nouveaux-nés et les jeunes enfants. Il s'agit de la transformation de l'hémoglobine en méthémoglobine à des seuils toxiques, induite par des métabolites de la prilocaïne (Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, 2003, 17, 111-136, Cox et. al). Plusieurs accidents provoqués par la prilocaïne ont été reportés (Eur. J. Pediatr., 1999, 158, 785-788, Frey et al ; The Journal of Emergency Medicine, 2004, 26, 85-88, Hahn et al.).

Plusieurs formulations ont donc été développées pour pallier ce problème. Ainsi, des formulations liposomales de lidocaïne sont disponibles sur le marché américain : l'ELA-Max[®] et le LMX[®]. Il existe également un patch commercial comprenant une émulsion de lidocaïne, dénommé Lidoderm[®]. Toutefois, ces formulations comprennent un grand

nombre d'excipients, présentent encore une toxicité relativement élevée et une teneur en lidocaïne limitée.

Par ailleurs, des formulations comprenant un mélange eutectique de lidocaïne et d'un acide gras ont été décrits dans l'art antérieur.

5

Ainsi, la demande japonaise publiée sous le numéro JP 2012-214412 A propose des formulations comprenant une émulsion d'une huile eutectique de lidocaïne et d'un acide gras en C8 ou plus. Toutefois, cette demande enseigne l'utilisation préférentielle d'excipients tels qu'une diphénylhydramine ou du diisopropyladipate. De nombreux autres excipients sont également recommandés. On notera par ailleurs que ce document recommande d'éviter l'emploi d'acide stéarique dans les formulations.

10

De même, la demande internationale WO 2013/083910 enseigne l'utilisation d'acides gras en tant qu'excipients pour la fabrication d'émulsions huile-dans-eau riches en lidocaïne. Les acides gras, de préférence l'acide laurique ou l'acide tridécanoïque, sont utilisés en combinaison avec la lidocaïne pour produire une phase huileuse à invariant eutectique liquide, homogène et riche en lidocaïne (notamment entre 40% et 60% en poids). Toutefois, cette demande décrit l'utilisation d'autres excipients dans les formulations, qui peuvent inclure entre autres des épaississants et des émulsionnants, notamment pour l'obtention d'« auto-émulsions ». On notera enfin que toutes les formulations exemplifiées contiennent plusieurs classes d'excipients, en plus des acides gras et de l'eau.

15

20

Ainsi, les mélanges eutectiques de lidocaïne et d'acide gras de l'art antérieur sont inclus dans des formulations comprenant de nombreux excipients, qui confèrent également une toxicité relativement élevée auxdites formulations. Ceci exclut leur utilisation chez le nouveau-né ou sur une peau lésée.

25

Il existe donc un besoin pour des formulations contenant de la lidocaïne comme principe actif, notamment sous forme d'émulsions, utiles pour l'anesthésie locale topique, l'antalgie locale topique ou en tant que retardant sexuel, et présentant une toxicité suffisamment faible pour envisager une utilisation chez le nouveau-né ou sur une peau lésée. Une telle formulation devrait présenter les propriétés suivantes :

30

- concentration suffisante du principe actif dans la formulation,
- toxicité faible,
- stabilité de la formulation,
- rhéologie compatible avec une application topique à des températures

35 notamment comprises entre 0°C et 40°C,

- cinétique de diffusion à travers la peau humaine adéquate,
- physiologiquement compatible avec la peau.

Il est à noter que dans le cas d'une formulation pour application topique, telle une crème ou un gel permettant la délivrance transdermique d'un principe actif, les caractéristiques
5 suivantes sont particulièrement importantes pour envisager une exploitation commerciale:

- 1) Stabilité physicochimique,
- 2) Cinétique de délivrance transdermique du principe actif suffisamment rapide,
- 3) Viscosité élevée,
- 10 4) Toxicité faible, et de préférence action bénéfique (protectrice) de la peau, et
- 5) En cas d'utilisation pour application sur peau lésée, la formulation est de préférence stérile.
- 6) pH physiologique, proche de 7

Pour obtenir une composition répondant aux critères listés ci-dessus, l'homme du métier
15 a habituellement recours à plusieurs classes d'excipients, permettant d'atteindre chacune de ces propriétés de manière indépendante :

1) Stabilité physicochimique : La stabilité physique est une propriété importante, notamment pour des formulations comprenant une émulsion. Classiquement, sont utilisés dans le cas d'émulsions un ou plusieurs surfactants, qui évitent les phénomènes
20 de coalescence à l'origine d'une démixtion, en augmentant la charge de surface des gouttes de la phase discontinue, et ainsi leur répulsion électrostatique.

La stabilité chimique des émulsions est généralement obtenue par l'utilisation d'excipients qualifiés de conservateurs, tels les antioxydants, qui inhibent la dégradation chimique du principe actif par voie oxydante de manière sacrificielle en réagissant avec
25 les espèces oxydantes à la place du principe actif. Alternativement, il peut être envisagé d'associer au principe actif un excipient qui forme avec lui un complexe moléculaire ; le principe actif ainsi complexé est alors moins accessible et/ou moins réactif pour les réactions de dégradation.

2) Cinétique : Classiquement, il existe deux manières d'améliorer la cinétique de
30 délivrance transdermique du principe actif :

- a) augmenter la teneur de la formulation en principe actif, notamment par ajout d'un ou plusieurs excipients augmentant la solubilité du principe actif. On peut notamment citer les excipients qui, associés au principe actif, conduisent à un système à invariant eutectique dont la température de fusion eutectique est

inférieure à 25°C, tels que décrits par exemple dans la demande internationale WO 2013/083910, ou

b) associer au principe actif un excipient « promoteur de perméation transcutané », qui accélère la cinétique de diffusion du principe actif à travers le *Stratum Corneum* (barrière physiologique naturelle de la peau).

3) Viscosité : De nombreux excipients permettant d'accroître la viscosité des formulations topiques sont connus dans l'art. Ainsi, on peut utiliser des épaississants hydrophiles, typiquement solubles dans des formulations de type gel hydrophile ou dans la phase aqueuse externe (continue) d'émulsions ou de formulations liposomales. Ces épaississants hydrophiles sont le plus souvent de nature polymérique.

4) Faible toxicité : cette caractéristique est obtenue par un choix d'excipients à l'innocuité prouvée, et optionnellement par ajout d'excipients aux vertus anti-inflammatoires et/ou émollientes.

5) Stérilisation : Dans le cas où la composition ne peut pas être stérilisée à l'aide d'un autoclave (procédé qui impose le chauffage de la formulation à une température élevée), des agents antimicrobiens doivent être utilisés.

Ainsi, l'homme du métier serait incité, pour atteindre l'objectif précité, d'ajouter encore d'autres excipients aux formulations de l'art antérieur.

6) pH physiologique : Des espèces acides ou basiques peuvent être incorporées dans les formulations afin d'obtenir un pH physiologique compatible avec la peau, proche de 7.

Résumé de l'invention

De manière surprenante, la Demanderesse a mis au point des compositions pharmaceutiques de lidocaïne sous forme d'émulsion huile-dans-eau utiles pour l'anesthésie locale topique, l'antalgie locale topique ou en tant que retardant sexuel, présentant toutes les propriétés listées ci-dessus, et ce à l'aide d'une seule classe d'excipients pharmaceutiques : les acides gras.

Un premier objet de l'invention vise donc une émulsion huile dans l'eau comprenant de la lidocaïne et au moins un acide gras selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle possède :

- un pH physiologique compris entre 6 et 8 ;
- une stabilité thermique comprise entre 5°C et 80°C ;
- une viscosité comprise entre 10 Pa.s et 1000 Pa.s pour une contrainte de 0,01 s⁻¹;

- une cinétique de perméation transcutanée (explants de peau humaine) de la lidocaïne comprise entre 50% et 150% comparativement à l'EMLA
- une toxicité (mesurée sur cellules HACAT) comprise entre 60% et 120% comparativement à l'EMLA.

5 Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une émulsion huile-dans-eau constituée d'eau et d'une phase huileuse, ladite phase huileuse étant constituée de lidocaïne et d'un acide gras choisi parmi l'acide laurique, l'acide tridécanoïque, l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique et leurs mélange, préférentiellement ladite phase huileuse est constituée de lidocaïne, d'un premier acide
10 gras et d'un second acide gras,

le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque,

le second acide gras étant choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique, et leurs mélanges.

Les acides gras utilisés dans les compositions selon l'invention jouent les cinq rôles
15 suivants : agent eutectique (stabilité chimique), émulsifiant (stabilité physique), épaississant (viscosité), promoteur de perméation cutanée (cinétique de diffusion), et agent protecteur de la peau (faible toxicité). Les compositions selon l'invention sont ainsi particulièrement inoffensives, en particulier en comparaison avec les formulations commerciales existantes. La Demanderesse a en particulier démontré que les émulsions
20 de l'invention sont particulièrement peu toxiques, et il est supposé que leur toxicité est liée à la toxicité intrinsèque de la lidocaïne, et non aux agents de formulations (tels que l'eau et les acides gras). Au contraire, les acides gras auront une action bénéfique sur la peau, ce qui permet notamment d'envisager une application sur peau lésée.

En outre, les excipients des émulsions selon l'invention sont peu onéreux et peu
25 polluants, d'autant plus lorsque les acides gras utilisés sont d'origine naturelle. De plus, leur procédé de fabrication est particulièrement simple et nécessite des apports énergétiques faibles : une agitation de la phase huileuse incluant les acide gras et la lidocaïne avec de l'eau durant quelques minutes permet d'obtenir les émulsions selon l'invention.

30 Les émulsions selon l'invention sont ainsi particulièrement avantageuses en termes de coût de production et de contraintes environnementales, notamment comparées aux formulations commerciales de lidocaïnes actuellement sur le marché. Ces avantages sont particulièrement importants compte tenu de la quantité de formulations à base de lidocaïne produites à l'échelle mondiale.

En outre, comparées aux formulations de la demande internationale WO 2013/083910, les émulsions de l'invention, de par l'utilisation du second acide gras, présentent une meilleure stabilité physicochimique.

- Un autre objet de l'invention concerne une phase huileuse à invariant eutectique
- 5 constituée de lidocaïne, d'un premier acide gras et d'un second acide gras,
- le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque,
- le second acide gras étant choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique et leurs mélanges.

- Un autre objet de l'invention vise un procédé de préparation des émulsions selon
- 10 l'invention.

Un autre objet de l'invention a trait à une composition pharmaceutique ou vétérinaire comprenant ou constituée de l'émulsion selon l'invention.

- Un autre objet de l'invention concerne les compositions pharmaceutiques ou vétérinaires selon l'invention pour utilisation en tant que médicaments, de préférence pour application
- 15 topique, en particulier en tant qu'analgésique, antalgique ou retardant sexuel.

La présente invention a également pour objet un dispositif médical comprenant la composition pharmaceutique ou vétérinaire de l'invention.

Définitions

- 20 Une « émulsion huile-dans-eau », lipophile dans hydrophile (L/H), est constituée de deux phases liquides : une phase huileuse interne, dispersée sous forme de gouttelettes dans une phase hydrophile externe. Ainsi, la phase huileuse est la phase lipophile discontinue, dispersée dans la phase aqueuse discontinue. Dans les émulsions selon l'invention, la phase hydrophile est essentiellement constituée d'eau.

- 25 Dans la présente invention, on parlera indifféremment de « gouttes », de « gouttelettes » ou de « globules » pour désigner la phase interne huileuse des émulsions.

- Par « phase hydrophile essentiellement constituée d'eau », on entend au sens de la présente invention que la phase hydrophile externe est constituée majoritairement d'eau, par exemple à 99% ou plus en masse. Elle peut contenir éventuellement des traces de
- 30 composés organiques, par exemple résultant de la solubilité résiduelle dans l'eau des composants de la phase huileuse ou d'impuretés, mais ces traces représentent moins de 2%, de préférence moins de 1% en masse de la phase aqueuse. Notamment, une faible proportion d'acides gras et de lidocaïne peuvent être solubilisés dans l'eau.

- Les émulsions selon la présente invention sont caractérisées par le diamètre moyen des
- 35 gouttes d'huile, aussi appelée taille moyenne des gouttes d'huile. Ce diamètre moyen

est mesuré de préférence par granulométrie Laser. Il est par exemple mesuré à l'aide d'un granulomètre laser *Zetasizer Nano ZS®* (Malvern Instrument, Orsay, France), par spectroscopie à corrélation de photon à 25°C et 90° d'angle de diffusion.

Par « acide gras », on entend au sens de la présente invention un composé hydrocarboné à chaîne aliphatique, linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, en C₅ à C₂₄,
5 préférentiellement C₁₂ à C₂₄, et comprenant une fonction acide carboxylique.

Les acides gras saturés linéaires comprenant de 12 à 24 atomes de carbone sont les acides de formules générales suivantes : H₃C-(CH₂)_n-COOH, où n varie de 10 à 22. Des exemples d'acides gras saturés linéaires comprenant de 12 à 24 atomes de carbone
10 sans être limité à ceux-ci sont les suivants : l'acide laurique ou acide dodécanoïque (C12:0), l'acide tridécylique ou acide tridécanoïque (C13:0), l'acide myristique ou acide tétradécanoïque (C14:0), l'acide palmitique ou acide hexadécanoïque (C16:0), l'acide stéarique ou acide octodécanoïque (C18:0), l'acide arachidique ou acide eicosanoïque (C20:0), l'acide béhénique ou acide docosanoïque (C22:0) et l'acide lignocérique ou
15 acide tétracosanoïque (C24:0).

L'expression « acide gras insaturé comprenant de 12 à 24 atomes de carbone » désigne un acide gras monoinsaturé ou polyinsaturé.

Les acides gras linéaires monoinsaturés comprenant de 12 à 24 atomes de carbone sont les acides de formules générales suivantes :

20
$$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}, \text{ où } p \text{ varie de } 9 \text{ à } 21$$

$$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{HC}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}, \text{ où } n \text{ et } p \text{ varient de } 0 \text{ à } 20 \text{ et } n + p \text{ varient de } 8 \text{ à } 20.$$

La stéréoisométrie de chaque insaturation peut être *cis* ou *trans*.

Des exemples d'acides gras monoinsaturés linéaires comprenant de 12 à 24 atomes de carbone sans être limité à ceux-ci sont les suivants :

L'acide laurooléique ou acide cw-9-dodécanoïque (C12:1- ω -3), l'acide oléique ou acide cw-9-octadécénoïque (C18:1- ω -9) et l'acide sélacholéique ou acide cw-15-tétracosénoïque (C24:1- ω -9).

Des exemples d'acides gras polyinsaturés linéaires comprenant de 12 à 24 atomes de carbone sans être limité à ceux-ci sont les suivants :

L'acide linoléique ou acide cis-cis-9,12-octadécadiénoïque (C18:2- ω -6), l'acide g-linoléique ou acide cis-cis-cis-6,9,12-octadécatriénoïque (C18:3- ω -6) et l'acide arachidonique ou acide cis-cis-cis-cis-5,8,11,14-icosatétraénoïque (C20:4- ω -6).

L'acide laurique, aussi appelé acide dodécanoïque, est un acide gras linéaire et saturé
35 en C12 (*i.e.* comprenant douze atomes de carbone).

L'acide oléique est un acide linéaire insaturé en C18 (*i.e.* comprenant dix-huit atomes de carbone) comprenant une seule insaturation (double liaison) *cis* entre les carbones 9 et 10 (C18:1- ω -9).

L'acide stéarique est un acide gras linéaire et saturé en C18 (*i.e.* comprenant dix-huit atomes de carbone). L'acide myristique est un acide gras linéaire et saturé en C14 (*i.e.* comprenant quatorze atomes de carbone).

La lidocaïne (ou 2-(Diéthylamino)-N-(2,6-diméthylphényl)-acétamide, CAS 137-58-6) présente deux fonctions comprenant un atome d'azote : une fonction dialkylamino et une fonction amide.

10 Le terme « phase huileuse homogène » signifie selon l'invention que la totalité de la lidocaïne et des acides gras présents dans le mélange liquide sont miscibles.

Le terme « phase huileuse stable » signifie que la phase huileuse reste liquide et homogène, sans altération de sa nature chimique, idéalement indéfiniment. En pratique, les phases huileuses de l'invention dans un flacon fermé disposé à l'abri de la lumière
15 demeurent liquides et transparentes durant au moins 11 mois, de préférence au moins 12 mois, en particulier au moins 18 mois, de manière préférée entre toutes au moins 2 ans.

Le terme « émulsion stable » signifie que l'on n'observe pas de phénomènes de démixtion ni de variation importante du diamètre moyen des gouttes d'huile dans l'émulsion, ni d'altération chimique de ses composants (en particulier du principe actif, ici la lidocaïne), idéalement indéfiniment. En pratique, les émulsions de l'invention demeurent sous forme de gels ou de liquides visqueux, ne présentent pas de dégradation chimique, et conservent un diamètre moyen des gouttes dans une fourchette raisonnable durant au moins 11 mois, de préférence au moins 12 mois, en
20 particulier au moins 18 mois, de manière préférée entre toutes au moins 2 ans, et ce notamment dans des conditions de vieillissement accéléré ou après stérilisation en autoclave.

Au sens de la présente invention, une « composition pharmaceutique » est une composition comprenant des constituants généralement sûrs, non toxiques et ni
30 biologiquement ni autrement non souhaitables, et qui sont acceptables pour une utilisation pharmaceutique chez l'homme. Par analogie, une « composition vétérinaire » comprend des constituants généralement sûrs, non toxiques et ni biologiquement ni autrement non souhaitables, et qui sont acceptables pour une utilisation vétérinaire.

Un « anesthésique local » est un principe actif qui inhibe de façon réversible la
35 propagation des signaux le long des nerfs par blocage des canaux sodium et qui produit

des effets anesthésiques sur une partie du corps d'un patient sans nécessité de l'endormir.

Description détaillée

5 *Emulsions huile-dans-eau*

La présente invention concerne en premier lieu une émulsion huile dans l'eau comprenant de la lidocaïne et au moins un acide gras selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle possède :

- un pH physiologique compris entre 6 et 8 ;
- 10 - une stabilité thermique comprise entre 5°C et 80°C ;
- une viscosité comprise entre 10 Pa.s et 1000 Pa.s pour une contrainte de 0,01 s⁻¹;
- une cinétique de perméation transcutanée (explants de peau humaine) de la lidocaïne comprise entre 50% et 150% comparativement à l'EMLA
- 15 - une toxicité (cellules HACAT) comprise entre 60% et 120% comparativement à l'EMLA.

Plus particulièrement, la présente invention concerne une émulsion huile-dans-eau constituée d'eau et d'une phase huileuse constituée de lidocaïne, d'un premier acide gras et d'un second acide gras,

20 le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque, de préférence l'acide laurique,

le second acide gras étant choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique et leurs mélanges, notamment les mélanges comprenant 2 ou 3 de ces acides gras..

25 La phase huileuse des émulsions selon l'invention est avantageusement une phase huileuse à invariant eutectique. L'expression « phase huileuse à invariant eutectique » signifie qu'à une température constante, dite eutectique, la fusion totale d'au moins un des deux solides constituant le mélange est observée, quelle que soit la proportion des composés présents dans le mélange. Est entendu par solide un des deux corps purs à l'état solide. La composition particulière où la fusion de tous les solides constituant le mélange est totale, à la température eutectique, est dite composition eutectique. Une propriété essentielle des mélanges à invariant eutectique, pour des solides non miscibles à l'état solide, est d'abaisser le point de fusion des composés purs constituant le mélange, autrement dit la courbe de liquidus, sur l'ensemble du domaine de compositions. En effet, de part et d'autre du point eutectique, et au-dessus de la

30

35

température eutectique, seul un des deux constituants purs est en équilibre avec un liquide homogène. Cet abaissement de température est maximum à la composition eutectique.

De préférence, le second acide gras est choisi parmi :

- 5 - l'acide oléique, l'acide stéarique,
 - un mélange binaire d'acides gras en toutes proportions, notamment les mélanges : acide oléique/acide stéarique, acide oléique/acide myristique, acide stéarique/acide myristique, acide oléique/acide palmitique, acide stéarique/acide palmitique ; et
- 10 - un mélange ternaire d'acide gras en toutes proportions, notamment les mélanges acide oléique/acide stéarique/acide myristique et acide oléique/acide stéarique/acide palmitique.

Dans un mode de réalisation préféré, le second acide gras comprend au moins de l'acide oléique et/ou l'acide stéarique.

- 15 Avantageusement, le premier acide gras est l'acide laurique et le second acide gras est l'acide oléique, optionnellement en mélange avec de l'acide myristique et/ou palmitique. Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les émulsions sont constituées d'eau et d'une phase huileuse constituée de lidocaïne, d'un premier acide gras et d'un second acide gras,

- 20 le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque, de préférence l'acide laurique, et

 le second acide gras étant l'acide oléique et/ou l'acide stéarique, de préférence l'acide oléique.

- La phase huileuse des émulsions de l'invention contient de préférence entre 10% et 60% en masse de lidocaïne, de manière encore préférée entre 30% et 55% en masse de lidocaïne, par rapport au poids total de la phase huileuse. Selon une variante préférée, la phase huileuse des émulsions de l'invention comprend 50% en masse de lidocaïne.
- 25 Autrement dit, dans l'émulsion selon l'invention le rapport massique entre la lidocaïne et le mélange des premier et second acides gras est avantageusement compris entre 0.5 et 3, de manière encore plus avantageuse entre 0.8 et 2.5, de manière encore plus

- 30 avantageuse entre 1 et 2, et est de préférence égal à 1.

L'émulsion selon l'invention comprend avantageusement entre 1% et 20% en masse de lidocaïne, encore plus avantageusement entre 2% et 16% ou entre 2% et 9% en masse de lidocaïne, par rapport à la masse totale de l'émulsion. De manière encore préférée,

l'émulsion selon l'invention comprend entre 2.5% et 7% en masse de lidocaïne, par exemple 6% en masse de lidocaïne, par rapport à la masse totale de l'émulsion.

Avantageusement, le rapport massique entre le premier acide gras et le second acide gras est compris entre 0,5 et 10, encore plus avantageusement entre 0,8 et 7, de manière encore préférée entre 1 et 5.

L'émulsion selon l'invention comprend avantageusement entre 60% et 96% en masse d'eau, encore plus avantageusement entre 80% et 96% ou entre 85% et 95% en masse d'eau, par rapport à la masse totale de l'émulsion. De manière encore préférée, l'émulsion selon l'invention comprend entre 88% et 94% en masse d'eau, par exemple 88% en masse d'eau, par rapport à la masse totale de l'émulsion.

Dans un mode de réalisation particulier, l'émulsion selon l'invention est constituée de :

- de 2% à 9% en masse, de préférence de 3 à 6% en masse de lidocaïne,
- de 2% à 9% en masse, de préférence de 3 à 5% en masse d'acide laurique,
- de 0,5% à 9% en masse, de préférence de 0,5 à 1,5% en masse d'acide oléique et/ou d'acide stéarique, et
- et une quantité suffisante d'eau pour atteindre les 100% massiques, par rapport à la masse totale de l'émulsion.

Dans ce mode de réalisation particulier, la phase huileuse des émulsions de l'invention contient de préférence entre 10% et 60% en masse de lidocaïne, de manière encore préférée entre 30% et 55% en masse de lidocaïne, par rapport au poids total de la phase huileuse. Selon une variante préférée, la phase huileuse des émulsions de l'invention comprend 50% en masse de lidocaïne. Autrement dit, dans l'émulsion selon l'invention le rapport massique entre la lidocaïne et le mélange des premier et second acides gras est avantageusement compris entre 0.5 et 3, de manière encore plus avantageuse entre 0.8 et 2.5, de manière encore plus avantageuse entre 1 et 2, et est de préférence égal à 1.

En outre, dans ce mode de réalisation particulier, avantageusement, le rapport massique entre le premier acide gras et le second acide gras est compris entre 0,5 et 10, encore plus avantageusement entre 0,8 et 7, de manière encore préférée entre 1 et 5.

Selon une variante avantageuse, l'émulsion selon l'invention est constituée de :

- 6% en masse de lidocaïne,
 - 5% en masse d'acide laurique,
 - 1% en masse d'acide oléique et/ou d'acide stéarique, et
 - 88% d'eau,
- par rapport à la masse totale de l'émulsion.

Selon une autre variante avantageuse, l'émulsion selon l'invention est constituée de :

- 3% en masse de lidocaïne,
- 2,5% en masse d'acide laurique,
- 0,5% en masse d'acide oléique et/ou d'acide stéarique, et
- 5 - 94% d'eau,

par rapport à la masse totale de l'émulsion.

Selon une autre variante avantageuse, l'émulsion selon l'invention est constituée de :

- 4.5% en masse de lidocaïne,
- 3.75% en masse d'acide laurique,
- 10 - 0.75% en masse d'acide oléique, et
- 91% d'eau,

par rapport à la masse totale de l'émulsion.

On constate que le pH des émulsions de l'invention peut être qualifié de physiologique.

Il est compris entre 6,5 et 8,5, de préférence entre 7 et 8, de manière encore préférée
15 entre 7,3 et 7,7. Les émulsions de l'invention sont donc compatibles avec une utilisation
par voie topique, sans ajustement supplémentaire du pH par ajout d'excipients tels que
des tampons.

En outre, les émulsions de l'invention sont homogènes et stables, notamment à une
température comprise entre 0°C et 40°C, en particulier entre 0°C et 37°C ou entre +4°C
20 et 37°C. Elles restent notamment stables lorsqu'elles sont conservées au réfrigérateur à
une température comprise entre 5°C et +10°C, ou lorsqu'elles sont conservées à
température ambiante, notamment entre 15°C et 25°C.

Ainsi, on observe que les émulsions selon l'invention présentent un diamètre moyen des
gouttes d'huile compris entre 100 nm et 600 nm, de préférence compris entre 150 nm et
25 350 nm. Ce diamètre moyen n'est pas ou est peu affecté par un stockage prolongé (par
exemple au moins 11 mois, de préférence au moins 12 mois, de manière encore
préférée au moins 18 mois, de manière préférée entre toutes au moins 2 ans), même en
conditions de vieillissement accéléré.

La stabilité des émulsions de l'invention permet de les stériliser en autoclave par
30 chauffage à une température comprise entre 100°C et 150°C, éventuellement sous une
pression comprise entre 1 bar et 5 bar, par exemple 2 bar, de préférence pendant 10 à
25 minutes, en particulier 15 minutes. Ce type de stérilisation permet d'éviter l'emploi
d'excipients supplémentaires, tels des agents antimicrobiens.

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, les émulsions de l'invention sont stériles.

Phase huileuse à invariant eutectique

La présente invention concerne également une phase huileuse constituée de lidocaïne, d'un premier acide gras et d'un second acide gras,

le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque,

5 le second acide gras étant choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique et leurs mélanges, notamment les mélanges comprenant 2 ou 3 de ces acides gras. On constate que les phases huileuses de l'invention sont à invariant eutectique. Les phases huileuses de l'invention sont typiquement sous forme de liquide transparent, notamment d'aspect huileux. En effet, le choix judicieux des
10 premier et second acide gras, ainsi que des additifs optionnels, permet d'éviter la formation de cristaux ou de co-cristaux à ces températures.

Les phases huileuses de l'invention sont donc sous forme liquide, homogènes et stables, notamment à une température comprise entre 0°C et 40°C, en particulier entre 0°C et 10°C. Ceci résulte notamment des liaisons hydrogènes qui se forment entre la fonction
15 acide carboxylique (COOH) des acides gras et la fonction amide de la lidocaïne (NHCO). Dans les phases huileuses selon l'invention, la fonction amine de la lidocaïne est quasi totalement sous forme base non ionique, et les acides gras présents dans la phase huileuse sont sous forme d'acides quasi totalement non ionique. Les interactions entre ces espèces sont en effet de nature faiblement ionique. Cela signifie que la fonction
20 aminée de la lidocaïne n'est pas sous sa forme acide $RR'NH^+$ et que la fonction acide carboxylique des acides gras n'est pas sous sa forme basique $R''COO^-$. Le taux de sel est négligeable, inférieur à une valeur de 5% en masse, plus particulièrement inférieur à une valeur de 1% en masse. Expérimentalement, on observe que la conductivité ionique des phases eutectiques de l'invention est de 3 $\mu S/cm$, ce qui confirme un faible caractère
25 ionique.

De préférence, dans les phases huileuses de l'invention, le second acide gras est choisi parmi :

- l'acide oléique, l'acide stéarique,
- un mélange binaire d'acides gras en toutes proportions, notamment les
30 mélanges : acide oléique/acide stéarique, acide oléique/acide myristique, acide stéarique/acide myristique, acide oléique/acide palmitique, acide stéarique/acide palmitique ; et
- un mélange ternaire d'acide gras en toutes proportions, notamment les mélanges acide oléique/acide stéarique/acide myristique et acide oléique/acide
35 stéarique/acide palmitique.

Dans un mode de réalisation préféré, le second acide gras comprend au moins de l'acide oléique et/ou l'acide stéarique.

Avantageusement, le premier acide gras est l'acide laurique et le second acide gras est l'acide oléique, optionnellement en mélange avec de l'acide myristique et/ou palmitique.

5

Avantageusement, le premier acide gras est l'acide laurique et le second acide gras est l'acide oléique.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les phases huileuses sont constituées de lidocaïne, d'un premier acide gras et d'un second acide gras,

10 le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque, de préférence l'acide laurique, et

le second acide gras étant l'acide oléique et/ou l'acide stéarique, de préférence l'acide oléique.

La phase huileuse de l'invention contient de préférence entre 10% et 60% en masse de lidocaïne, de manière encore préférée entre 30% et 55% en masse de lidocaïne, par rapport au poids total de la phase huileuse. Selon une variante préférée, la phase huileuse de l'invention comprend 50% en masse de lidocaïne.

15

Autrement dit, dans la phase huileuse de l'invention, le rapport massique entre la lidocaïne et le mélange des premier et second acides gras est avantageusement compris entre 0.5 et 3, de manière encore plus avantageuse entre 0.8 et 2.5, et est de préférence égal à 1.

20

Avantageusement, dans la phase huileuse de l'invention, le rapport massique entre le premier acide gras et le second acide gras est compris entre 0,5 et 10, encore plus avantageusement entre 0,8 et 7, de manière encore préférée entre 1 et 5.

25

Procédé de préparation des émulsions de l'invention

Les émulsions de l'invention peuvent être préparées selon un procédé comprenant les étapes successives suivantes :

a) formation d'une phase huileuse liquide constituée de lidocaïne, d'un premier acide gras et d'un second acide gras,

30

le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque,

le second acide gras étant choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique et leurs mélanges, notamment les mélanges comprenant 2 ou 3 de ces acides gras.

35

b) ajout d'eau à la phase huileuse liquide de l'étape a),

c) optionnellement agitation du mélange obtenu à l'étape b), de préférence à l'aide d'un agitateur de type « vortex », de préférence à une vitesse de 1000 à 5000 tour/minute (avantageusement 2000 tour/minute) par exemple durant 30 secondes,

- d) optionnellement stérilisation en autoclave par chauffage à une température
5 comprise entre 100°C et 150°C, de préférence entre 120°C et 125°C, avantageusement sous une pression comprise entre 1 bar et 5 bar, de préférence 2 bar, avantageusement pendant 10 à 25 minutes, en particulier 15 minutes.

La phase huileuse liquide de l'étape a) correspond à la phase huileuse de l'invention, en particulier selon ses modes de réalisation et variantes particuliers.

- 10 La phase huileuse de l'étape a) peut être obtenue à température ambiante, en mélangeant la lidocaïne, le premier acide gras, le second acide gras, et l'éventuel additif initialement solides, et en attendant longtemps, typiquement un mois. Dans la présente invention toutefois, le mélange de lidocaïne et d'un premier acide gras, d'un second acide gras, et éventuellement d'un additif est de préférence porté à une température
15 comprise entre 50°C et 80°C, par exemple 70°C, jusqu'à obtention d'une phase eutectique huileuse, typiquement pendant 10 minutes. L'étape b) peut être conduite sous agitation ou en mode statique (*i.e.* sans agitation). En effet, le seul effet de la chalmeur permet d'obtenir la phase huileuse de l'étape a).

- Selon une variante de l'invention, à l'étape b), on ajoute la quantité d'eau nécessaire
20 pour former l'émulsion finale. Selon une autre variante, on ajoute à l'étape b) une quantité d'eau inférieure à la quantité finale dans l'émulsion. Le procédé comprend alors une étape c') d'ajustement de la quantité d'eau dans l'émulsion pour obtenir la concentration finale recherchée.

- On observe que certaines émulsions de l'invention sont auto-émulsifiantes, si bien que
25 l'étape c) d'agitation est optionnelle.

- Lorsque le procédé de l'invention comprend l'étape c) d'agitation, l'agitateur de type vortex utilisé à l'étape c) est par exemple l'agitateur type vortex Lab Dancer d'Ika. L'agitation est avantageusement conduite pendant une durée comprise entre 5 secondes et 10 minutes, de préférence entre 20 secondes et 5 minutes
30 (avantageusement 30 secondes), déterminée par l'homme du métier en fonction de la taille du lot d'émulsion, de la taille de l'agitateur et de la vitesse d'agitation (qui est de préférence à une vitesse de 1000 à 5000 tour/minute, avantageusement 2000 tour/minute).

- L'étape c) est de préférence conduite à une température comprise entre 0°C et 40°C,
35 de préférence entre 10°C et 30°C, de manière encore préférée entre 15°C et 25°C.

L'émulsion particulière composée de 88% d'eau, de 6% de lidocaïne, de 5% d'acide laurique et de 1% d'acide oléique est auto-émulsifiante : il est possible de l'obtenir en ajout de la phase huileuse à l'eau sans agitation, les phases huileuse et aqueuse initialement séparées conduisent à la formation d'une émulsion, sous forme d'un gel
5 transparent homogène, pour une durée de deux ans. Ce caractère est exceptionnel car la plupart des émulsions connues de l'homme du métier sont formés par agitation vigoureuse de la phase huileuse à la phase aqueuse, qui conduit à un phénomène de séparation des deux phases avec le temps.

10 *Compositions et applications thérapeutiques*

La présente invention a également trait à une composition pharmaceutique ou vétérinaire comprenant ou constituée de l'émulsion selon l'invention.

De préférence, la composition pharmaceutique ou vétérinaire ou vétérinaire selon l'invention ne comprend pas d'autres excipients que ceux compris dans l'émulsion. Ainsi,
15 de préférence, les compositions selon l'invention sont constituées des émulsions de l'invention telles que décrites plus haut.

Les compositions de l'invention se présentent typiquement sous forme de gel ou de liquide visqueux. De préférence, il s'agit d'un gel.

Selon un mode de réalisation, les compositions selon l'invention sont de préférence
20 destinées à une application topique.

Selon un autre mode de réalisation, les compositions de l'invention sont destinées à une administration par voie orale, notamment dans le cas d'une utilisation dans le cadre d'une intervention dentaire (anesthésie locale au niveau des gencives notamment).

Selon un autre mode de réalisation, les compositions de l'invention sont destinées à une
25 administration par voie intraveineuse.

Selon un autre mode de réalisation, les compositions de l'invention sont destinées à une administration par infiltration (en particulier infiltration introculaire), notamment lorsqu'il s'agit d'une utilisation dans le traitement ou la prévention des douleurs oculaires, ou dans une anesthésie de l'œil.

30 La présente invention concerne également la composition pharmaceutique ou vétérinaire de l'invention pour son utilisation en tant que médicament, de préférence pour application topique.

En particulier, du fait de la présence de la lidocaïne comme principe actif, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont utiles en tant qu'analgésique,
35 antalgique ou retardant sexuel.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une composition selon l'invention pour la fabrication d'un médicament, notamment d'un antalgique, d'un anesthésique ou d'un retardant sexuel.

Les compositions de l'invention présentent une action cicatrisante liée aux effets
5 cicatrisants notoires des acides gras utilisés. Ainsi, elles peuvent être utilisées sur une peau lésée, notamment en tant qu'anesthésique local ou antalgique. Elles sont également utiles en tant que cicatrisants.

En outre, par rapport à l'EMLA[®], les émulsions de l'invention présentent les avantages suivants :

- 10 - elles sont moins toxiques, car elles contiennent uniquement des acides, de préférence d'origine naturelle, et elles ne contiennent pas de prilocaïne,
- elles présentent une gamme de concentration plus étendue en lidocaïne (de 3 à 9%)
- elles ont un pH neutre, alors que l'EMLA[®] possède un pH basique,
- 15 - leur température eutectique est typiquement de l'ordre de 5°C, alors que celle de l'EMLA[®] est de 18°C : les émulsions de l'invention sont donc plus stables et ce que une gamme plus large de température.

En outre, les émulsions de l'invention possèdent une diffusion relativement lente de la lidocaïne, avec une bonne régularité. Les émulsions selon l'invention permettent ainsi
20 d'obtenir un effet retard de diffusion de la lidocaïne, utile notamment pour les applications en tant que retardant sexuel.

Les émulsions selon l'invention permettent également une diffusion plus étalée dans le temps, pouvant s'avérer utile pour des applications en tant qu'antalgique ou anesthésique local.

25 En outre, la faible toxicité des compositions pharmaceutiques de l'invention permet une utilisation chez le nouveau-né et le nourrisson, en particulier en tant qu'anesthésique local, par exemple avant une prise de sang ou une piqûre.

La composition vétérinaire selon l'invention est particulièrement utile en tant qu'analgésique ou antalgique.

30 Elle est de préférence utilisée en tant que médicament chez un mammifère, notamment chez un mammifère terrestre. Les mammifères terrestres comprennent notamment les animaux de compagnie (tels que les chiens, les chats, les furets, etc.), les animaux des parcs zoologiques (tels les fauves, les singes, les marsupiaux, etc.) et les animaux d'élevages (les ovins, les bovins, les chevaux, les caprins, les lapins, etc.).

La présente invention concerne également une méthode de traitement de la douleur, ou une méthode d'anesthésie locale, ou une méthode de traitement de l'éjaculation précoce, comprenant l'administration, de préférence par voie topique, d'une dose efficace d'une composition de l'invention chez un patient en ayant besoin.

- 5 Le patient peut être un homme ou un animal, de préférence un mammifère tel que défini plus haut.

La dose efficace d'une composition de l'invention varie en fonction de nombreux paramètres tels que, par exemple, le poids, l'âge, le sexe, la douleur à traiter et la sensibilité du patient à traiter. Cette dose efficace sera déterminée par l'homme du
10 métier en fonction de ces paramètres.

La présente invention concerne également un dispositif médical comprenant la composition pharmaceutique ou vétérinaire de l'invention.

Description des figures

- 15 La figure 1 présente des clichés photographiques obtenus au microscope électronique à transmission des émulsions A, B, C, D, E et F. La taille indiquée sur ces clichés correspond à la somme du produit diamètre*volume des particules divisé par la somme des volumes des particules.

La figure 2 représente l'évolution de la taille des globules d'huile en fonction du temps
20 (axe des abscisses : temps (t) en jours ; axe des ordonnées : taille en nm) pour les émulsions A (carrés), C (triangles), E (croix) (graphe de gauche) et B (carrés), D (triangles), F (croix) (graphe de droite).

La figure 3 représente l'évolution de la taille des globules d'huile en fonction du temps
25 (axe des abscisses : temps (t) en jours ; axe des ordonnées : taille en nm) pour les émulsions B (carrés) et B' (ronds).

La figure 4 représente la viscosité à faible contrainte de cisaillement des émulsions A à F en fonction de la proportion massique de lidocaïne (axe des abscisses : proportion massique de lidocaïne en % ; axe des ordonnées : viscosité en Pa.s). Emulsion A : carré vide. Emulsion B : carré noir. Emulsion C : disque blanc. Emulsion D : disque noir.
30 Emulsion E : triangle blanc. Emulsion F : triangle noir.

La figure 5 représente le taux de survie cellulaire après 24 heures suite à 30 minutes d'exposition des cellules de l'émulsion A (disque blanc), l'émulsion B (disque noir), l'émulsion C (carré blanc), l'émulsion D (carré noir), l'émulsion E (triangle blanc), l'émulsion F (triangle noir), le LMX® (losange blanc) et l'EMLA® (losange noir) en fonction
35 de la proportion massique en anesthésique (lidocaïne et prilocaïne) en % pour différente

type de cellule : HACAT (graphe en haut à gauche), NCTC (graphes en haut à droite et en bas à gauche), Fibroblaste F37 (graphe en bas à droite).

La figure 6 représente la cinétique de diffusion sur membranes de silicone des émulsion A (disque blanc), émulsion B (dique noir), émulsion C (carré blanc), émulsion D (carré noir), émulsion E (triangle blanc), émulsion F (triangle noir en comparaison avec l'EMLA® (losange noir), le LMX® (losange blanc) et le Lidoderm® (croix) (axe des abscisses : temps (t) en heures ; axe des ordonnées : concentration d'anesthésique (lidocaïne et prilocaïne) mesurée en μM).

La figure 7 représente la cinétique de diffusion sur peau humaine des émulsions A à F en fonction du temps, en particulier en comparaison avec EMLA®, LMX® et Lidoderm® (axe des abscisses : temps (t) en heures ; axe des ordonnées : concentration en anesthésique de la formulation en fonction du temps normalisé par rapport à la concentration en anesthésique dans l'EMLA en %) : émulsion A (disque blanc), émulsion B (dique noir), émulsion C (carré blanc), émulsion D (carré noir), émulsion E (triangle blanc), émulsion F (triangle noir), LMX® (losange blanc), EMLA® (losange noir) et Lidoderm® (croix).

Figure 8 : Cinétiques de diffusion membranaire de la lidocaïne pour 0,5 gramme des formulations 11K, 12S, 13U, A, B, C, EMLA et LMX à travers des épidermes humains artificiels reconstruits de $0,5 \text{ cm}^2$ « SKINETHIC™ RHE ». Les concentrations en lidocaïne mesurées par HPLC couplée à la spectroscopie de masse sont celles du volume interne de 1 mL de la cellule de Franz.

Les exemples qui suivent sont donnés à titre purement illustratif, et ne sauraient être interprétés comme limitant d'une quelconque manière la présente invention.

Exemples

Dans ce qui suit, le « diamètre moyen des gouttes d'huile dans les émulsions » étudiées sera indifféremment appelé « diamètre moyen », « taille moyenne des gouttes », « taille moyenne des globules », ou « granulométrie ».

Matériel

Chambre de Comptage Cellulaire. MALASSEZ.

pH-mètre. SevenCompactTMS220 (METTLER TOLEDO).

Granulomètre Laser. La taille des globules, l'index de polydispersité et le potentiel zêta ont été mesuré à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instrument, Orsay, France)

les caractéristiques granulométriques ont été déterminées par spectroscopie à

corrélation de photon à 25°C et 90° d'angle de diffusion. Le potentiel zêta est déterminé par l'étude de la mobilité électrophorétique des globules dans l'eau.

Rhéomètres. Rheometer HAAKE RheoStress RS600 (Thermo Electron Corporation), Rhéomètre Rheostation (Formulation).

- 5 **Spectrophotomètre UV-Visible.** 7315 Spectrophotometer (Jenway).

1. Préparation des Emulsions

10 **Protocole de préparation des phases huileuses eutectiques.** Une phase eutectique résultant d'un mélange de lidocaïne et d'un ou plusieurs acides gras est préalablement préparée. Cette phase eutectique est un liquide homogène transparent d'aspect huileux. Le mélange de lidocaïne et d'acides gras est porté à une température de 70°C jusqu'à obtention d'une phase eutectique huileuse, typiquement pendant 10 minutes.

15 **Protocole de préparation des émulsions.** Les émulsions sont obtenues en ajoutant à une phase huileuse eutectique (préparée comme indiqué ci-dessus) de l'eau, puis ce mélange est agité à l'aide un agitateur automatique de type « vortex » Lab Dancer d'Ika à 2000 tour/minutes pendant 10 secondes. Aucun autre excipient n'est utilisé pour ces compositions.

Les compositions des sept émulsions A-F les plus représentatives sont indiquées dans le tableau 1 ci-dessous :

Emulsion Constituant	A	B	B'	C	D	E	F
Lidocaïne	3%	3%	3%	6%	6%	9%	9%
Acide laurique	3%	2,5%	2,5%	6%	5%	9%	1,5%
Acide oléique	0%	0,5%	0%	0%	1%	0%	1,5%
Acide stéarique	0%	0%	0,5%	0%	0%	0%	0%
Eau	94%	94%	94%	88%	88%	82%	82%

Tableau 1

Les émulsions B, B', D et F sont donc des émulsions selon l'invention, tandis que les émulsions A, C et E constituent des exemples comparatifs.

2. Caractérisation des Emulsions

25 Les émulsions A à F ont été caractérisées comme indiqué ci-après.

La taille des globules, l'index de polydispersité et le potentiel zêta ont été mesurés à l'aide d'un granulomètre laser. Les caractéristiques granulométriques ont été déterminées par spectroscopie à corrélation de photon à 25°C et 90° d'angle de diffusion. Le potentiel zêta est déterminé par l'étude de la mobilité électrophorétique des globules dans l'eau.

Rhéologie

Protocole. Les expériences ont été menées à l'aide deux rhéomètres, un rhéomètre classique de géométrie cône-plan de 35 mm de diamètre et de 1° d'angle et un rhéomètre microfluidique. Les mesures ont été effectuées à 25°C.

Ref.	Taille moyenne des gouttes	Rhéologie et Aspect Visuel	Viscosité (Pa.s)	pH
A	544 nm	Liq. Visq. Transp.	15	7,2
B	144 nm	Liq. Visq. Transp.	10	7,1
B'	148 nm	Gel Transparent.	/	6,7
C	578 nm	Gel Transparent	296	7,2
D	180 nm	Gel Transparent	1169	7,3
E	603 nm	Gel Transparent	65	7,2
F	237 nm	Gel Transparent	43	7,2

Tableau 2

5

Les émulsions se présentent sous forme de liquide visqueux transparent pour des faibles teneurs en lidocaïne (3% en masse) et un second acide gras insaturé (acide oléique) (émulsions A et B), et sous forme de gel transparent pour des fortes teneurs en lidocaïne (6% et 9% en masse). Ainsi, il est possible d'ajuster la rhéologie de l'émulsion en jouant sur le rapport phase huileuse/eau et sur la taille des globules d'huile en jouant sur la nature des acides gras de la phase huileuse.

Lorsque l'acide gras insaturé de l'émulsion liquide (B) est remplacé par un acide gras saturé (émulsion résultante (B')), on obtient un gel. Les autres caractéristiques, taille des globules d'huile et pH, sont semblables, comme reporté dans le tableau 2.

La nature rhéologique des émulsions (i.e. liquide visqueux ou gel) a été quantifiée par une mesure des propriétés rhéologiques des émulsions. La nature rhéologique et la viscosité à faible taux de cisaillement ($0,01 \text{ s}^{-1}$), qui est représentative des émulsions dans leur conditionnement (i.e. faible cisaillement), des formulations A à F, est indiquée dans le tableau 2. L'évolution de la viscosité à faible contrainte de cisaillement avec la composition en lidocaïne pour les émulsions sans acide oléique (A, C et E) et avec acide oléique (B, D et F) sont présentées sur la figure 4. Elle est maximale pour des teneurs à 6% en masse en lidocaïne.

Taille des gouttes

Protocole. 10 μl d'émulsion sont introduits dans un tube, 990 μl d'eau déionisée sont ajoutées et le tube est mélangé à l'aide d'un agitateur à 1800 tour/min durant 10 secondes. On laisse ensuite l'émulsion se stabiliser pendant 2 minutes à 25°C, puis la taille des gouttes est mesurée trois fois pour chaque émulsion.

25

Résultats. Les émulsions ont été étudiées par microscopie électronique à transmission (MET, voir résultats dans le tableau 2). Les clichés de la figure 1 mettent en évidence la nature discontinue des émulsions obtenues.

Les diamètres moyens des globules d'huile mesurés par MET sont différents de ceux mesurés par l'analyse granulométrique laser, mais la tendance est la même :

- 1) les émulsions incluant un seul acide gras, l'acide laurique (émulsions A, C et E), présentent un diamètre moyen de gouttes d'huile plus importants (environ 600 nm) que celles incluant deux acides gras, l'acide laurique et l'acide oléique (émulsions B, D et F) ou l'acide laurique et l'acide stéarique (émulsion B') (environ 200 nm) ; et
- 2) le diamètre moyen des gouttes de la phase discontinue (huileuse) est plus faible pour les émulsions de l'invention.

pH de l'émulsion

Le pH des émulsions est mesuré avec le pH-mètre SevenCompactTMS220 de METTLER TOLEDO, par immersion de l'électrode pH au sein de l'émulsion jusqu'à stabilisation du pH. On note que toutes les émulsions selon l'invention (B, B', D, et F) présentent un pH compris entre 6,5 et 7,5, c'est-à-dire dans une gamme de pH physiologique.

Emulsions commerciales. Les émulsions préparées dans les exemples sont comparées à des formulations commerciales de lidocaïne : EMLA® (fournisseur Aguettant), LMX® (fournisseur Ferndale Laboratories) et Lidoderm® (fournisseur ENDO Pharmaceuticals).

Leur composition et caractéristiques principales (mesurées comme indiqué ci-dessus) sont indiquées ci-dessous :

EMLA	Composition Massique	Eau	Lidocaïne 2,5%	Prilocaine 2,5%
		Huile de Ricin Hydrogénée 1,9%	Carbopol 974 P	NaOH
	Rhéologie	Gel	Aspect Visuel	Turbide
	Taille	165 nm	IP	0,19
	Potentiel ζ	-65 mV	pH	9,5

LMX	Composition Massique	Eau	Lidocaïne 4%	Alcool Benzylrique
		Carbomères	Cholesterol	Phospholipon 80H
		Tween 80	Propylene Glycol	Trolamine

	Vitamine E Acetate			
	Rhéologie	Gel	Aspect Visuel	Turbide
	Taille	7 90 nm	IP	0,57
	Potentiel ζ	-65 mV	pH	8,3

Lidoderm	Composition Massique	Eau	Lidocaine 5%	Alcool Polyvinylique
		Sorbitol Liquide	Aluminium Glycinate	Urée
		Glycerol	Acide Edétique	Gélatine
		Polyéthylène Téréphtalate	Acide Tartrique	Polyacrylate de Sodium
		Carbomère	Carmellose Sodique	Kaolin Lourd
		Para Hydroxybenzoate de Propyle	Para Hydroxybenzoate de Propyle	Propylèneglycol
	Rhéologie	Gel	Aspect Visuel	Turbide

3. Stabilité Thermodynamique des Emulsions

Evolution avec le temps

- 5 Les évolutions du diamètre moyen des gouttes d'huile des émulsions A à F avec le temps sont présentées sur la figure 2.

Le diamètre moyen des gouttes d'huile des émulsions dont la phase huileuse est composée de lidocaïne et d'acide laurique exclusivement (A, C et E) varie de manière importante durant le premier mois qui suit leur préparation, puis fluctue autour d'une valeur d'environ 600 nm sans se stabiliser par la suite. Le diamètre moyen des gouttes d'huile des émulsions dont la phase huileuse est composée de lidocaïne, d'acide laurique et d'acide oléique (B, D et F) varie de manière importante durant les deux premiers mois qui suivent leur préparation, puis se stabilise à une valeur proche de 300 nm par la suite, et ce pour au moins 11 mois.

- 15 Ces résultats confirment les mesures de diamètre moyen des gouttes d'huile des émulsions juste après formulation : les émulsions B, D et F sont plus stables que les formulations équivalentes A, C et E contenant uniquement de l'acide laurique.

Il est intéressant de remarquer que le remplacement de l'acide oléique (émulsion B) par l'acide gras saturé correspondant, l'acide stéarique (émulsion B'), mène à une émulsion

très stable dont le diamètre moyen des gouttes d'huile des émulsions est encore plus faible, environ 200 nm (voir tableau 2 et figure 3).

Vieillessement accéléré

La stabilité des émulsions a également été étudiée dans quatre types de conditions de

5 vieillessement accéléré :

- 1) centrifugation à 10 000 tour/min durant 30 minutes,
- 2) stérilisation standard à 121°C et 2 bar pendant 15 minutes,
- 3) cycles thermiques d'une heure entre 4°C et 40°C, et
- 4) cycles thermiques de 24 heures entre -25°C et 25°C.

10 Les résultats obtenus pour les émulsions A à F sont présentés dans le tableau 3.

conditions	t =0	Centrif.	Autoclave	Cycle T°C	
		30 000 rpm	121°C 2 bar	4°C/40°C	-25°C/25°C
Temps		15 min.	10 min.	1 h.	24 h.
B	140 nm	135 nm	167 nm	145 nm	192 nm
D	180 nm	168 nm	176 nm	183 nm	318 nm
F	237 nm	610 nm	250 nm	221 nm	241 nm
A	544 nm	330 nm	548 nm	621 nm	1618 nm
C	578 nm	603 nm	674 nm	617 nm	750 nm
E	603 nm	610 nm	657 nm	573 nm	546 nm

Tableau 3. Evolution des diamètres moyens des gouttes d'huile dans des conditions de vieillessement accéléré

Un phénomène de démixtion n'est observé dans aucun cas, et la stabilité des émulsions dans ces conditions de vieillessement accéléré est remarquable. Il est en particulier possible de stériliser et de conserver au réfrigérateur (+4°C) toutes les émulsions sans modification significative de la taille des gouttes d'huile.

4. Toxicité Cellulaire des Emulsions

20 **Abréviations**

Abréviation	Signification
HaCaT	lignée de cellules kératinocytes aneuploïdes immortelles spontanément transformée de la peau humaine adulte
DMEM	Milieu « Eagle » modifié de Dulbecco « Dulbecco's Modified Eagle Medium »
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
DiOC6	3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodide
FACS	Appareil permettant de réaliser les analyse par cytométrie de flux

Protocoles.

Milieux de Culture. Un million de cellules (HaCaT) est dilué dans 10 mL de milieu de culture dans une fiole de culture T75 et incubées à 37°C jusqu'à confluence, durant deux

ou trois jours. Les cellules sont tryptisées, comptées, et incubées à nouveau dans un milieu de culture complet DMEM fraîchement préparé.

Tryptisation des Cellules. Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lavées avec 10 mL de tampon phosphate (pH 7,2). 2 mL de trypsine (0,05% trypsine-EDTA) pour
5 détacher les cellules. Les cellules sont incubées à 37°C durant 7 minutes. 2 mL de DMEM sont ajoutés au milieu afin de stopper la tryptinisation. Les cellules sont transférées dans un tube et centrifugées à 1600 tour/minute durant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et 10 mL de DMEM sont ajoutés à la suspension cellulaire. 15
10 µL de bleu de tryptan sont ajoutés à 15 µL de suspension cellulaire dans un microtube de 1 mL. Les cellules sont dénombrées dans une chambre de comptage de cellules sous microscope.

Préparation des Plaques 96 Puits. Les cellules après comptage sont mises en suspension dans un milieu de culture complet DMEM à une concentration de 100 000 cellules/mL. 100 µL de suspension cellulaire sont ajoutés dans chaque puits et incubée
15 à 37°C la nuit jusqu'à obtention de la subconfluence.

Test de Toxicité Rouge Neutre. Le milieu de culture est éliminé après obtention de la subconfluence et 100 µL des formulations anesthésiante diluée (1/50, 1/100 ou 1/200) sont alors ajoutés. Les cellules sont incubées à 37°C durant 30 minutes. Elles sont ensuite lavées avec 150 µL de tampon phosphate (pH 7,2) et 100 µL de rouge neutre dilué dans le milieu DMEM sont ajoutés. Les cellules sont incubées à 37°C durant trois
20 heures, puis la solution de rouge neutre est éliminée. Les cellules sont lavées avec 150 µL de tampon phosphate (pH 7,2) puis une solution de 150 µL eau/éthanol/acide acétique 49/50/1 est ajoutée afin de stopper la réaction. Incubation 10 minutes et lecture de l'absorbance à 540 nm. Des tests de toxicité sont également réalisés après exposition
25 des cellules à la formulation anesthésiante et incubation pendant 20 heures dans le milieu de culture.

Test de Toxicité MTT. Le milieu de culture est ajouté et la formulation anesthésiante diluée est ajoutée aux cellules subconfluentes. Les cellules sont incubées à 37°C durant 30 minutes, puis le milieu est éliminé et 100 µL de MTT à 0,5 mg/mL dilué dans le milieu
30 de culture complet DMEM sont ajoutés. Le surnageant est alors éliminé, 100 µL de DMSO sont ajoutés et l'absorbance à 550 nm est mesurée. Des tests de toxicité sont également réalisés après exposition des cellules à la formulation anesthésiante et incubation 20 heures dans le milieu de culture.

Test de Toxicité DiOC6. Ajouter 2 mL de suspension cellulaire (250000 cellule/mL) dans
35 une boîte de pétri de 35 mm de diamètre et 10 mm de hauteur. Incubation des cellules

à 37 °C durant la nuit jusqu'à obtention de la subconfluence. Elimination du milieu de culture et ajout de 2 mL de formulation anesthésiante diluée à 1/100. Incubation à 37 °C durant 30 minutes, élimination de la solution anesthésiante et lavage avec 2 mL de tampon phosphate. Ajout de 2 mL de milieu de culture complet DMEM, incubation à 37°C

5 la nuit et élimination du milieu de culture. Lavage avec 2 mL de tampon phosphate et ajout de 500 µl de trypsine afin de détacher les cellules, puis, incubation à 37 °C durant 7 minutes. Ajout de 500 µl de milieu de culture. Collecte de la suspension cellulaire et centrifugation à 1600 tour/minute durant 7 minutes. Elimination du surnageant et ajout à la pastille de 500 µL de DiOC6 0,1 µM, puis, incubation dans l'obscurité à 37 °C durant

10 30 minutes. Centrifugation de la suspension cellulaire à 1600 tour/minute durant 10 minutes. Elimination du surnageant et ajout à la pastille de 500 µl d'iodure de propidium à 10µ/mL dans l'obscurité. Analyse de la suspension cellulaire par cytométrie de flux FACS.

Expérimentations sur Echantillons de Peau Humaine. Laver l'explant de peau humaine

15 avec un tampon phosphate et enlever la couche de graisse. Découpage de l'explant de peau en petits échantillons disposés dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre et 10 mm de hauteur. Application d'une formulation anesthésiante et incubation durant 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, une heure, deux heures, quatre heures et 24 heures. Découpage longitudinal de l'explant de peau en spaghettis. Ajout de 2 mL de trypsine à

20 0,25%, incubation dans un mélangeur durant deux heures à 37 °C ou toute la nuit à 4 °C. Enlever l'épiderme à l'aide d'un forceps et l'introduire dans un tube. Ajout de 2 mL de tampon trypsine à 0,25% incluant 1% de sérum fœtal bovin et incubation à 37 °C durant 30 minutes. Filtration du surnageant dans un nouveau tube. Comptage du nombre de cellule après mélange avec un volume égal de trypan bleu. Centrifugation à 1600

25 tour/minute afin de collecter les kératinocytes. Eliminer le surnageant et ajouter à la pastille 500 µL de DiOC6 à 0,1 µM, puis, incubation à 37 °C durant 30 minutes. Centrifugation de la suspension cellulaire à 1600 tour/minute durant 10 minutes, élimination du surnageant, puis, ajout de 500 µL de solution d'iodure de propidium à 10 µg/mL. Analyse de la suspension cellulaire par cytométrie de flux FACS.

30 Préparation du Milieu de Culture Complet DMEM. Composition pour 500 mL de milieu : 430 mL de DMEM 1X (4,5g/L D-glucose, [+] L-glutamine, [-] pyruvate), 5 mL de pyruvate de sodium à 1% (100 mM), 5 mL de tampon phosphate (1 M), 5 mL de Penicillin Streptomycin à 1%, 5 mL d'amphotéricine B à 1% (250 pg/mL) et 50 mL de sérum fœtal bovin à 10%.

Résultats. La cytotoxicité de l'EMLA[®] et du LMX[®] crème (formulation liposomale a 4% en lidocaïne), a été déterminée et comparée à celle des émulsions lidocaïne/acides gras A à F. Deux types de tests (MTT et rouge neutre) ont été réalisés, et portent sur trois modèles de cellules (NCTC, HaCaT, fibroblaste), pour des temps d'exposition de 30 minutes et une dilution de 1/50 des émulsions. La cytotoxicité a été évaluée juste après exposition et 24 heures après exposition.

5. Cinétiques de Diffusion Membranaire des Emulsions

Les cinétiques de diffusion membranaire de la lidocaïne à travers des membranes silicone de 125 µm d'épaisseur et de la peau humaine ont été mesurées à l'aide d'une cellule de Franz de 1 cm de diamètre et de réservoir interne de 6 mL (CLOUP) et d'un spectrophotomètre UV-visible.

Protocole. Le compartiment récepteur de la cellule de Franz est rempli avec un tampon phosphate de pH 7 sous agitation magnétique à 300 tour/minute. La membrane étudiée est insérée dans la cellule de Franz. Une masse de 1 gramme de formulation ou un patch est introduit dans le compartiment donneur et mis en contact avec la membrane. Le compartiment accepteur de la cellule de Franz est maintenu à 37 °C. Des prélèvements réguliers de 500 µL du compartiment accepteur sont effectués, dilués au 1/5 dans le tampon et l'absorbance est mesurée à 272 nm. 500 µL de tampons sont introduits après chaque prélèvement dans le compartiment accepteur afin de maintenir constant son volume.

Les deux solvants utilisés pour l'analyse par HPLC sont l'acétonitrile et une solution aqueuse de KH₂PO₄ 0,05 M, pris en proportions égales, le débit de solvant a été fixé à 1,25 mL/min. Le détecteur UV enregistre l'absorbance à 189 nm.

Résultats. Les cinétiques de diffusion ont été mesurées en insérant dans des cellules de Franz soit des membranes silicone (figure 6) soit des explants de peau humaine entière dégraissés (figure 7) et en dosant la lidocaïne des formulations anesthésiantes (émulsions et patch) ayant diffusée par HPLC. Les cinétiques de diffusion des formulations commerciales, le Lidoderm[®] patch et la crème EMLA[®] ont été mesurées simultanément à celles des six formulations représentatives A à F soit sur une membrane silicone soit sur un même explant de peau humaine. Dans le cas des cinétiques sur explant de peau humaine, comme la variation biologique des peaux de différents patients est élevée, les cinétiques de diffusion ont été normalisées par rapport à l'EMLA pour une durée de quatre heures.

Les cinétiques de diffusion mesurées à travers la peau humaine entière sont lentes. L'effet anesthésiant dont la cible biologique est une protéine cellulaire, prend effet avant que la lidocaïne puisse être dosée par cette méthode après avoir traversé toutes les strates de la peau humaine entière (*i.e.* derme, *Stratum Corneum*, couche basale et

5 épiderme). La lidocaïne est détectée à partir de deux heures et est quantifiée significativement pour des temps de trois et quatre heures.

Les mesures ont été moyennées sur trois essais pour l'*EMLA*® crème et le Lidoderm® patch, deux essais pour les émulsions C, D et B, et un essai pour les émulsions F, E et A.

10 6. Analyse de l'absorption transcutanée des émulsions

Le but de cette étude est d'étudier l'absorption de la lidocaïne contenue dans 8 formulations différentes, à travers l'épiderme humain reconstitué (SKINETIC).

Elle permet de fournir des informations sur l'absorption des formulations appliquées sur la surface d'un épiderme humain reconstitué qui sépare les deux chambres (chambre

15 donatrice et chambre réceptrice) Transwell.

L'effet sur la viabilité des épidermes a été évalué par un test de viabilité (MTT). L'effet sur l'organisation de l'épiderme (effet tissulaire) a été évalué par une méthode d'histologie.

20 **Protocole.** Les épidermes humains SKINETIC RHE ont été fournis par les Laboratories SkinEthic. Préparation des épidermes : après réception, les kits d'épiderme ont été stockés à température ambiante. Il est ensuite transféré dans le milieu d'entretien et on fait incubé à $37 \pm 3^\circ \text{C}$ et $5 \pm 1\%$ de CO_2 .

L'absorption d'une substance d'essai au cours d'une cinétique dans une période de

25 temps donnée est mesurée par analyse du fluide récepteur.

Les formulations testées sont les suivantes :

Code	Lidocaïne (%)	Acide laurique (%)	Acide oléique (%)	Acide Stéarique (%)	Eau (%)
Eau	NA	NA	NA	NA	NA
11K	6	5	1	0	88
12S	3	2,5	0,5	0	94
13U	3	2,5	0	0,5	94
A	6	5	0	1	88
B	4,5	3,75	0,75	0	91
C	4,5	3,75	0	0,75	91
EMLA	NA	NA	NA	NA	NA

LMX	NA	NA	NA	NA	NA
-----	----	----	----	----	----

Les crèmes EMLA et LMX sont utilisées comme témoins positifs. Les épidermes traités avec de l'eau ont été utilisés comme témoins négatifs.

Application des formulations testées : 1g/cm² des formulations à tester est déposé sur chaque épiderme à l'aide d'un capillaire. L'épiderme est ensuite mis à incuber à 37°C, 5% CO₂, 95% d'humidité. Chacune des formulations sont testées sur 3 épidermes pour s'assurer de la fiabilité des données collectées.

Pour chaque épiderme, le volume total du milieu récepteur est collecté et renouvelé avec du milieu frais à chaque moment de d'analyse, c'est-à-dire à 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120 and 240 minutes (8 points dans le temps différents). Les Echantillons sont stockés jusqu'au moment de l'analyse à -20°C.

Après traitement. A la fin de la cinétique, après la dernière collecte, deux épidermes / formulations sont soumis à un test MTT et un épiderme / formulation est prélevé pour l'analyse histologique.

MTT et extraction au formasan. À la fin de la période d'incubation, les épidermes sont rincés avec du PBS avec Ca²⁺ / Mg²⁺. Chaque épiderme est ensuite transféré dans une autre plaque de 24 puits contenant 300 pl / puits de solution de colorant MTT (1 mg / ml de MTT dans le milieu de test). Les plaques ont été incubées dans l'obscurité pendant 3 heures ± 15 minutes (37 ± 3 ° C, 5 ± 1% de CO₂). Après incubation dans le MTT, les tissus sont séchés avec du papier absorbant et transférés dans une plaque à 24 puits contenant 800 pl d'isopropanol, et 700 ul d'isopropanol est ajouté à la partie supérieure de chaque pièce rapportée. Les plaques sont incubées pendant 2 heures ± 5 minutes à température ambiante avec agitation sur un agitateur de plaque. Enfin, l'insert a été percé pour assurer la récupération du mélange du surnageant et du sous nageant l'isopropanol. Les extraits d'isopropanol combinés ont été brièvement homogénéisés et transférés sur une plaque de 96 puits (2 aliquotes séparées de 200 pi par condition). La densité optique (D.O.) a été mesurée à 570 nm en double (SM/SM).

Histologie. Les échantillons d'épiderme sont fixés dans le formol. Les échantillons sont mis dans de la paraffine et soumis à microtomie et à coloration par Hématoxyline-Eosine-Safran (HES). Les coupes générées sont numérisées en mode haute définitions et analysées par un histologiste spécialisé pour l'évaluation de l'effet sur la structure des éléments de l'épiderme.

Phase d'analyse. Tous les échantillons sont analysés pour leur teneur en Lidocaïne utilisant une analyse par HPLC et spectrométrie de masse.

Préparation des échantillons : Des échantillons du milieu récepteur à 8 points dans le temps sont stockés à -20 ° C jusqu'à l'analyse. Si nécessaire, les échantillons étudiés sont dilués dans du milieu d'entretien frais et de lidocaïne a été extrait par précipitation dans une solution d'étalon interne (prednisolone) à une concentration de 0,5 µM dans l'acétonitrile. 100 µl de surnageant sont transférés dans une plaque à 96 puits. 10 µl sont injectés dans la LC / MS-MS (API 4000).

Les échantillons sont ensuite analysés par la méthode analytique de chromatographie (LC) et de spectrométrie de masse MS/MS (**figure 8**).

10 Résultats.

Les cinétiques de diffusion mesurées dépendent du modèle de membrane utilisé, membranes silicone, épiderme artificiel reconstruit d'origine humaine et explant de peau humaine. Les cinétiques de diffusion au travers d'explants de peau humaine des nouvelles formulations sont comparables à celles des formulations commerciales. Ces résultats indiquent que les acides gras utilisés dans les nouvelles formulations sont d'excellents prometteurs de diffusion de la lidocaïne au travers de la peau humaine.

7. Transposition d'Echelle

Pour tester la robustesse du procédé de préparation des émulsions de l'invention (préparation par simple agitation vortex pendant 10 minutes à une vitesse de 2000 tpm (tour par minute), celui-ci a été mis en œuvre pour préparer un lot de 2g d'émulsion D et un lot de 100g d'émulsion D. Leurs caractéristiques ont ensuite été mesurées et comparées.

Elles sont résumées dans le tableau 7 ci-après. On constate qu'elles sont très proches.

Masse	2 g.	100 g.
Aspect Visuel	gel transparent	gel transparent
Taille	180 nm	221 nm
IP	0,10	0,15
Potentiel	-67 mV	-63 mV
PH	7,3	7,5

Tableau 7

Ainsi, le procédé de l'invention apparaît transposable à une échelle industrielle.

8. Conclusion

Les propriétés principales des émulsions A à F sont résumées dans le tableau 8 ci- après :

Formulation	A	B	C	D	E	F
Lidocaïne	3%	3%	6%	6%	9%	7,5%
Acide laurique	3%	2,5%	6%	5%	9%	1,5%
Acide oléique	0%	0,5%	0%	1%	0%	1,5%
eau	94%	94%	88%	88%	82%	82%
Rhéologie	liq. visq.	liq. visq.	gel	gel	gel	gel

Tableau 8. Résumé des caractéristiques des émulsions A à F

L'émulsion D selon l'invention apparaît comme la plus prometteuse : c'est un gel transparent de texture engageante, une émulsion très stable, faiblement toxique, dotée de performances adéquates en termes de cinétique de diffusion membranaire, et dont la transposition de la préparation à l'échelle industrielle semble réalisable avec le protocole de préparation décrit plus haut.

La comparaison des propriétés de l'émulsion D à trois formulations commerciales est présentée dans le tableau 9 ci- après.

Formulation	EMLA®	LMX®	Lidoderm®	D
Nature	émulsion	liposomes	patch	émulsion
Aspect	crème blanche	crème blanche	polymère blanc	gel transparent
Teneur massique en anesthésiant	Lidocaïne 2,5% Prilocaine 2,5%	Lidocaïne 4%	Lidocaïne 5%	Lidocaïne 6%
Excipients	3	8	16	2
pH	9,5	8,3		7,3

L'émulsion D selon l'invention possède donc toutes les qualités requises pour concurrencer les formulations commerciales EMLA®, Lidoderm® et LMX®.

REVENDICATIONS

1. Emulsion huile dans l'eau constituée d'eau et d'une phase huileuse, ladite phase huileuse étant constituée de lidocaïne et d'un acide gras choisi parmi l'acide laurique, l'acide tridécanoïque, l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique et leurs mélange, caractérisée en ce qu'elle possède :
- un pH physiologique compris entre 6 et 8 ;
 - une stabilité thermique comprise entre 5°C et 80°C ;
 - une viscosité comprise entre 10 Pa.s et 1000 Pa.s pour une contrainte de 0,01 s⁻¹;
 - une cinétique de perméation transcutanée (explants de peau humaine) de la lidocaïne comprise entre 50% et 150% comparativement à l'EMLA
 - une toxicité (mesurée sur cellules HACAT) comprise entre 60% et 120% comparativement à l'EMLA.
2. Emulsion huile-dans-eau selon la revendication 1, constituée d'eau et d'une phase huileuse, ladite phase huileuse étant constituée de lidocaïne, d'un premier acide gras et d'un second acide gras,
- le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque,
- le second acide gras étant choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique, et leurs mélanges.
3. Emulsion selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le rapport massique entre la lidocaïne et le mélange des premier et second acides gras est compris entre 0.8 et 2.5, de préférence 1.
4. Emulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le rapport massique entre le premier acide gras et le second acide gras est compris entre 0,5 et 10, encore plus avantageusement entre 0,8 et 7, de manière encore préférée entre 1 et 5.
5. Emulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend entre 1% et 20% en masse, de préférence entre 2 et 16% en masse de lidocaïne, de manière encore préférée entre 3% et 7% en masse de lidocaïne, par rapport à la masse totale de l'émulsion.

6. Emulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce qu'elle est constituée de :

- de 2% à 9% en masse, de préférence de 3 à 6% en masse de lidocaïne,
 - 5 - de 2% à 9% en masse, de préférence de 3 à 5% en masse d'acide laurique,
 - de 0,5% à 9% en masse, de préférence de 0,5 à 1,5% en masse d'acide oléique et/ou d'acide stéarique, et
 - et une quantité suffisante d'eau pour atteindre les 100% massiques,
- par rapport à la masse totale de l'émulsion.

10

7. Emulsion selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est constituée de :

- 6% en masse de lidocaïne,
- 5% en masse d'acide laurique,
- 1% en masse d'acide oléique,
- 15 - 88% d'eau,

par rapport à la masse totale de l'émulsion.

8. Emulsion selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est constituée de :

- 3% en masse de lidocaïne,
- 20 - 2,5% en masse d'acide laurique,
- 0,5% en masse d'acide oléique et/ou d'acide stéarique,
- 94% d'eau,

par rapport à la masse totale de l'émulsion.

25 9. Composition pharmaceutique ou vétérinaire comprenant ou constituée de l'émulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

10. Composition pharmaceutique ou vétérinaire selon la revendication 9 pour son utilisation en tant que médicament, de préférence pour application topique, par
30 administration par voie orale, intraveineuse ou par infiltration introculaire.

11. Composition pharmaceutique pour utilisation selon la revendication 10, en tant qu'analgésique, antalgique ou retardant sexuel.

12. Composition vétérinaire pour utilisation selon la revendication 10, en tant qu'analgésique ou antalgique.

13. Phase huileuse, de préférence à invariant eutectique, constituée de lidocaïne, d'un
5 premier acide gras et d'un second acide gras,

le premier acide gras étant l'acide laurique et/ou l'acide tridécanoïque,

le second acide gras étant choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide oléique, et leurs mélanges.

10 14. Phase huileuse à invariant eutectique selon la revendication 13, caractérisée en ce que le rapport massique entre la lidocaïne et le mélange des premier et second acides gras est compris entre 0.8 et 2.5, de préférence 1.

15 15. Phase huileuse à invariant eutectique selon la revendication 13 ou 14, caractérisée en ce que le rapport massique entre le premier acide gras et le second acide gras est compris entre 0,5 et 10, encore plus avantageusement entre 0,8 et 7, de manière encore préférée entre 1 et 5.

20 16. Procédé de préparation d'une émulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 comprenant les étapes successives suivantes :

a) formation d'une phase huileuse liquide selon l'une quelconque des revendications 13 à 15,

b) ajout d'eau à la phase huileuse liquide de l'étape a),

c) optionnellement agitation du mélange obtenu à l'étape b),

25 d) optionnellement stérilisation en autoclave par chauffage à une température comprise entre 100°C et 150°C, de préférence entre 120°C et 125°C, avantageusement sous une pression comprise entre 1 bar et 5 bar, de préférence 2 bar, avantageusement pendant 10 à 25 minutes, en particulier 15 minutes.

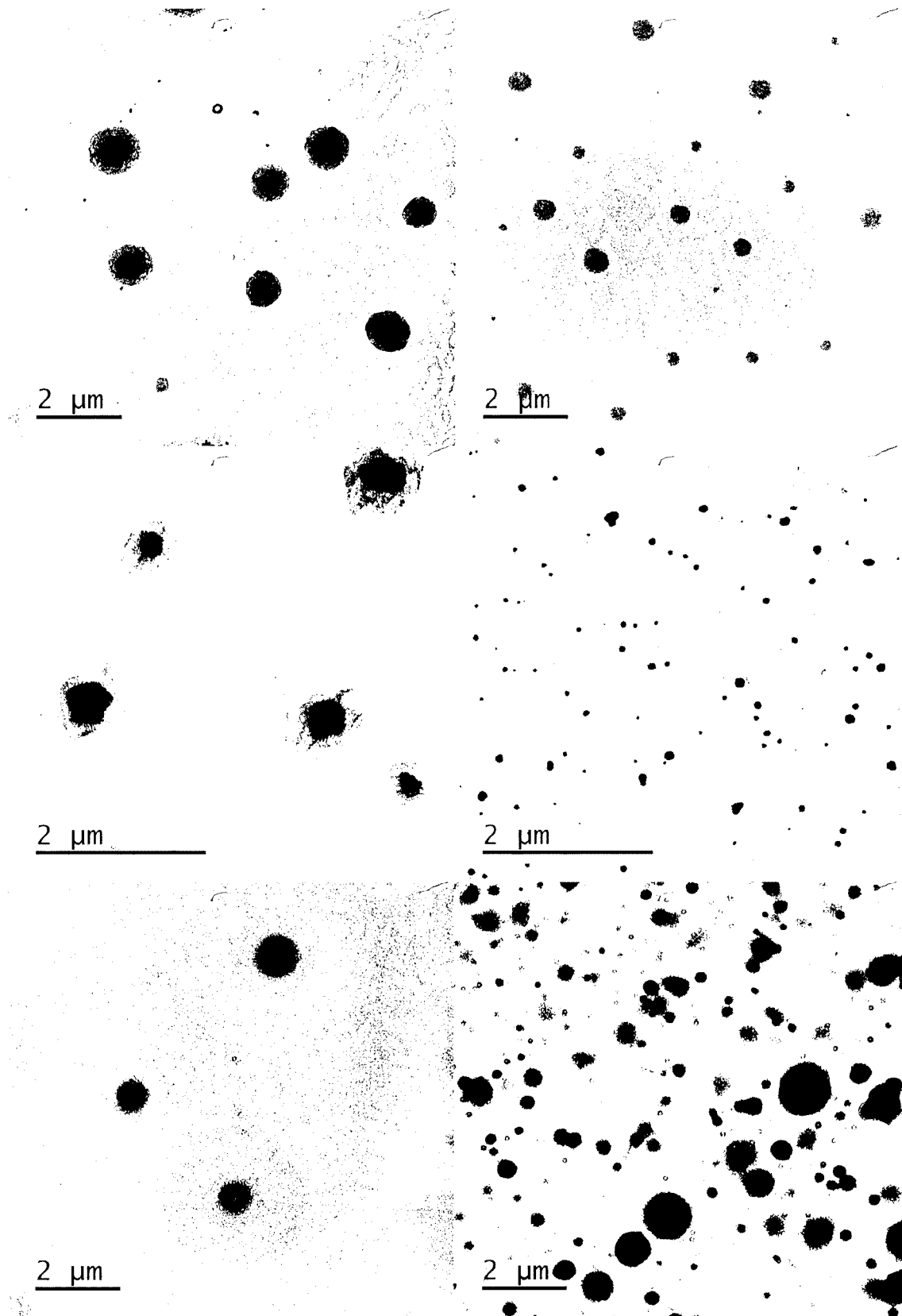


Figure 1

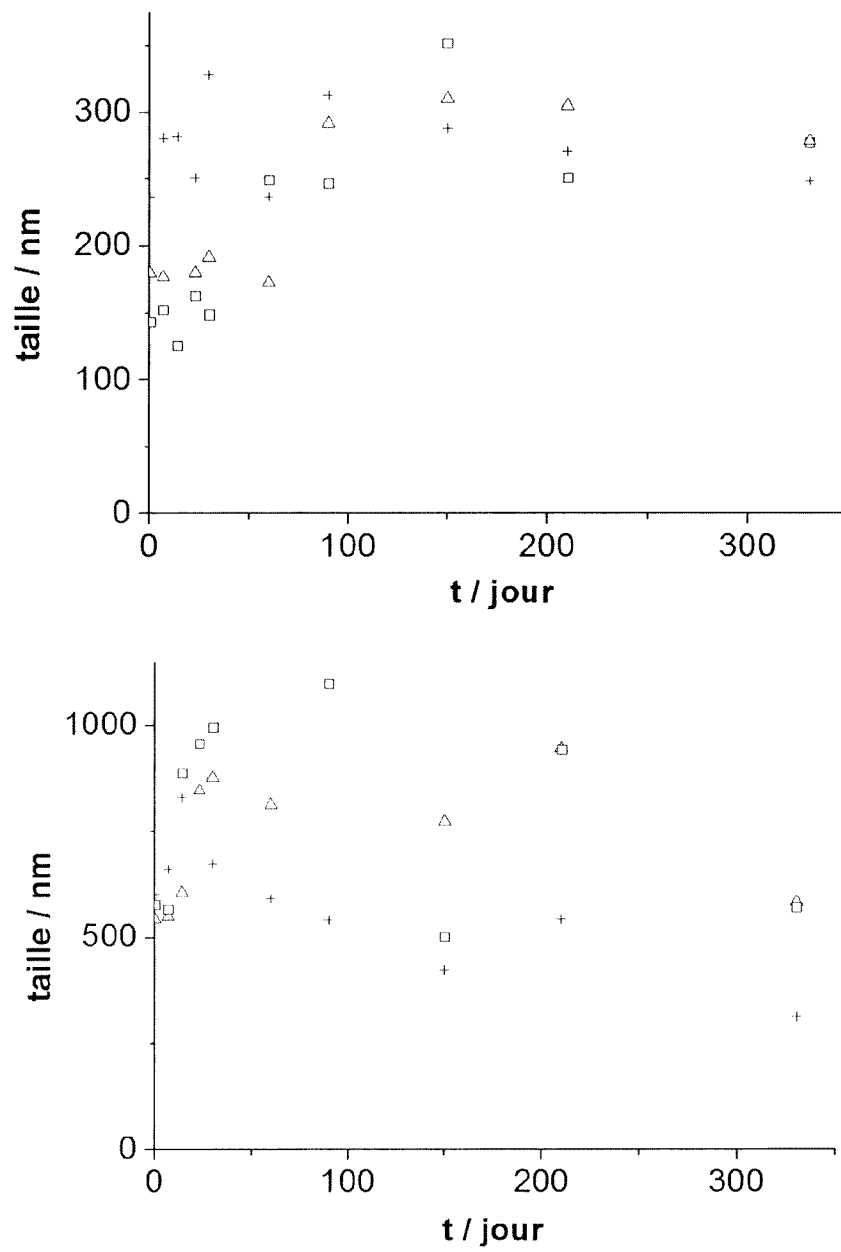


Figure 2

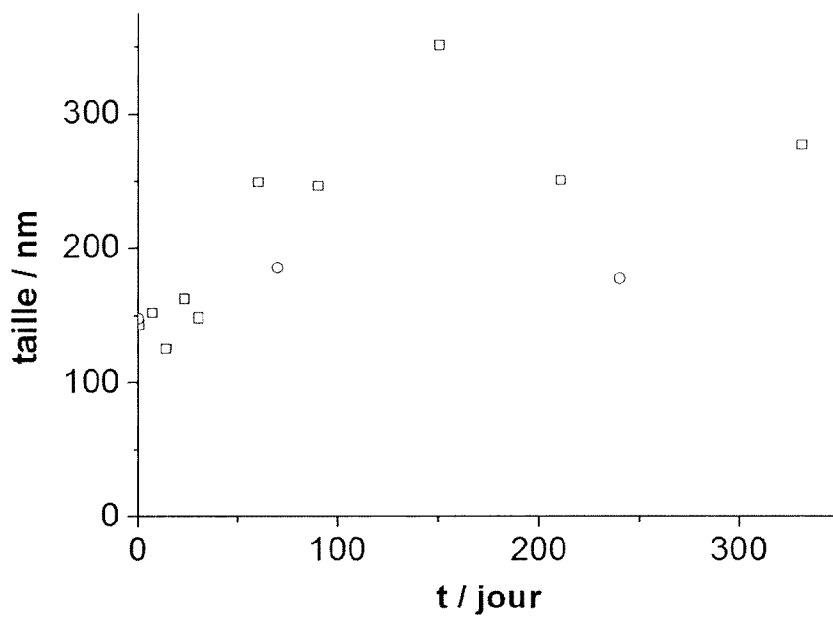


Figure 3

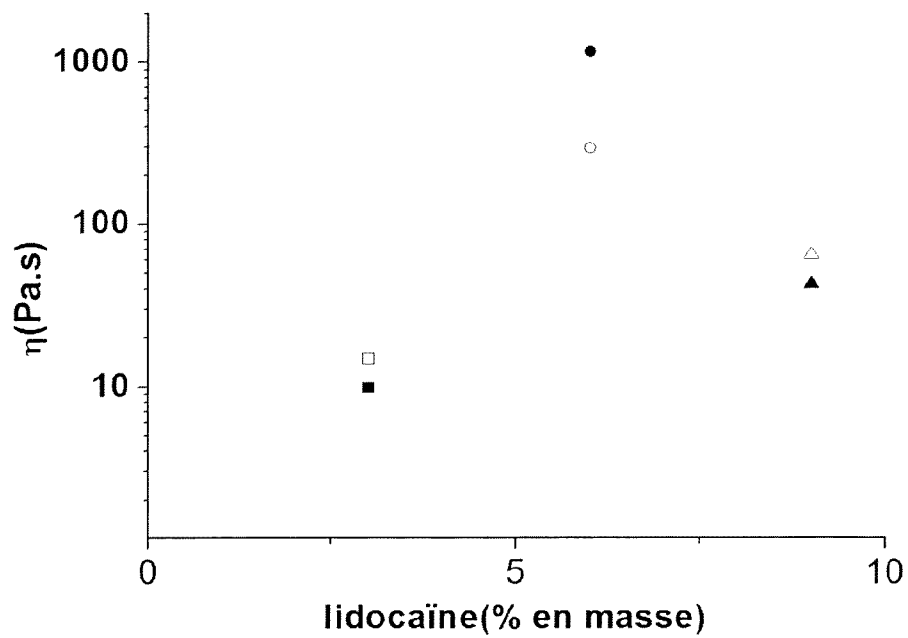


Figure 4

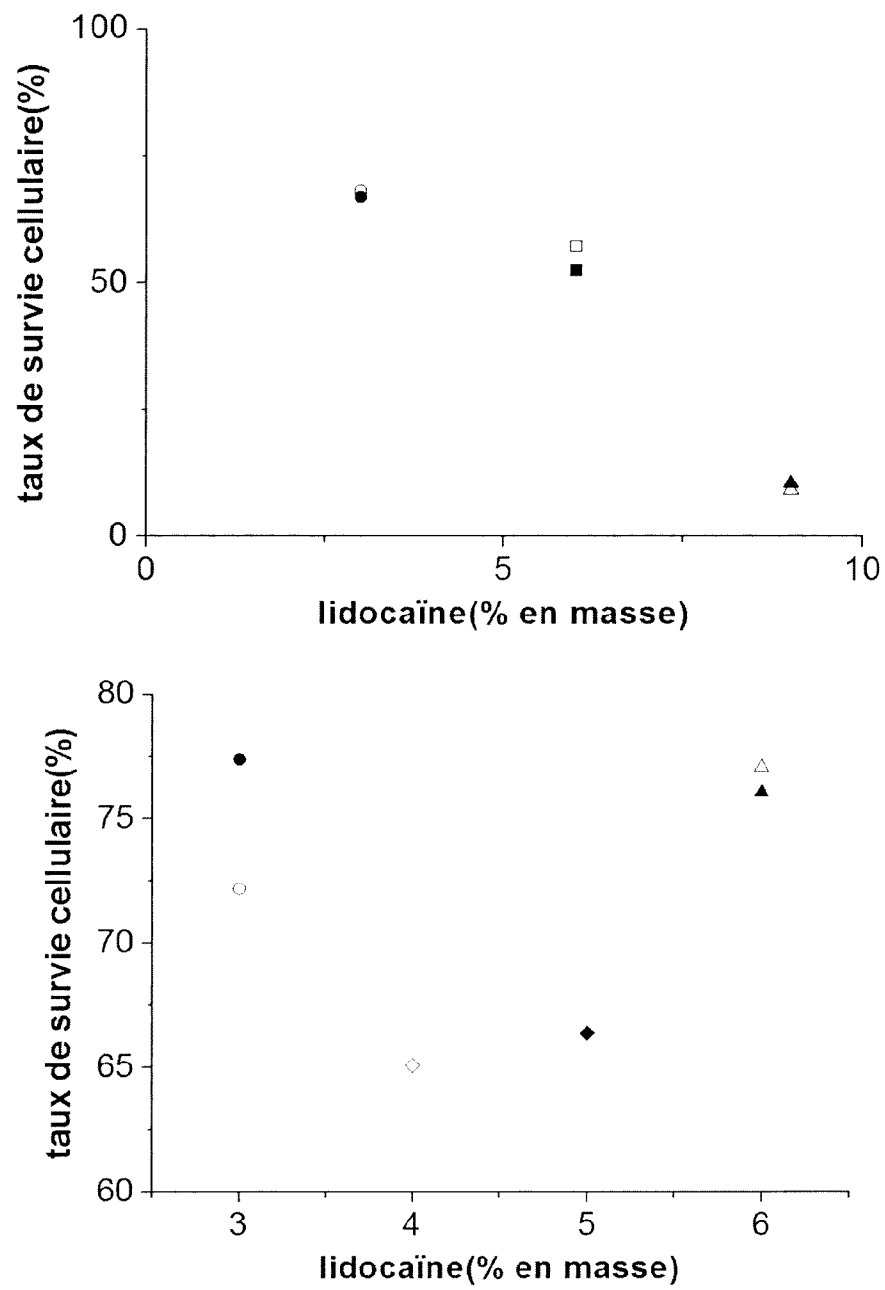


Figure 5

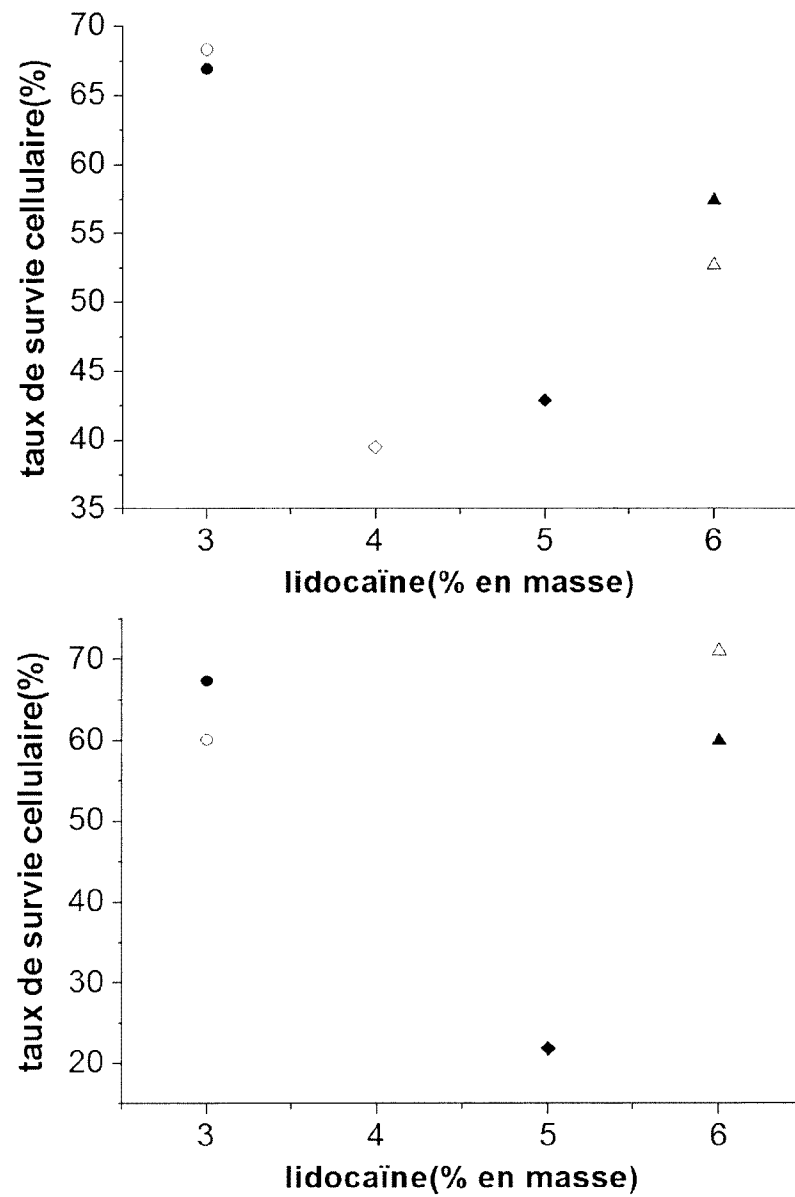


Figure 5 (suite)

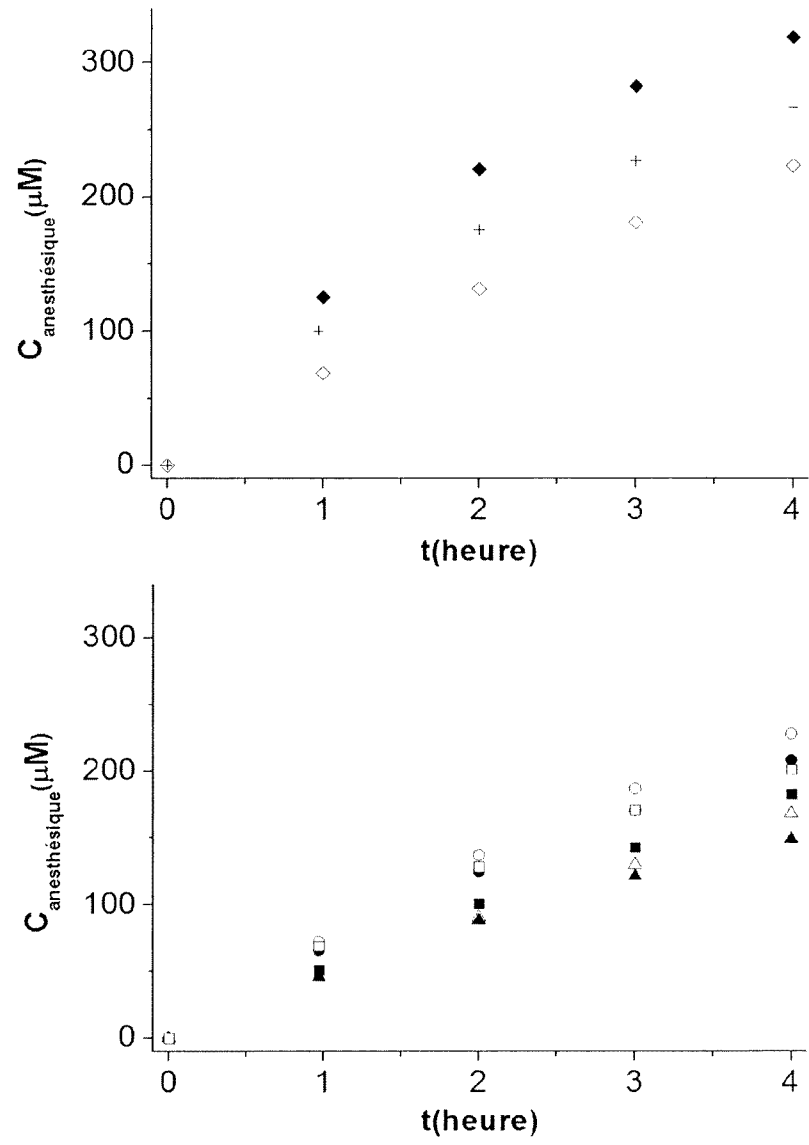


Figure 6

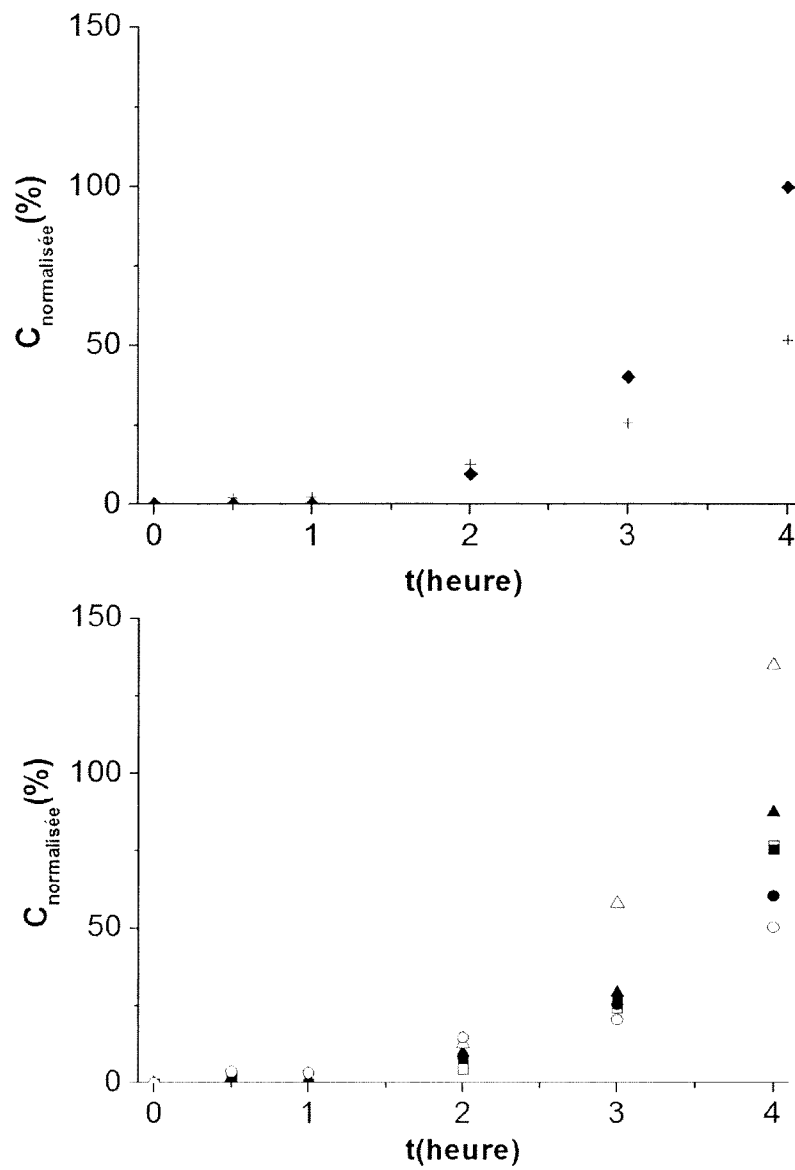


Figure 7

concentration en Lidocaïne
(ng/ml) (moyenne sur n=3
répétitions)

3 épidermes, en triple
Analyse par LC-MS/MS

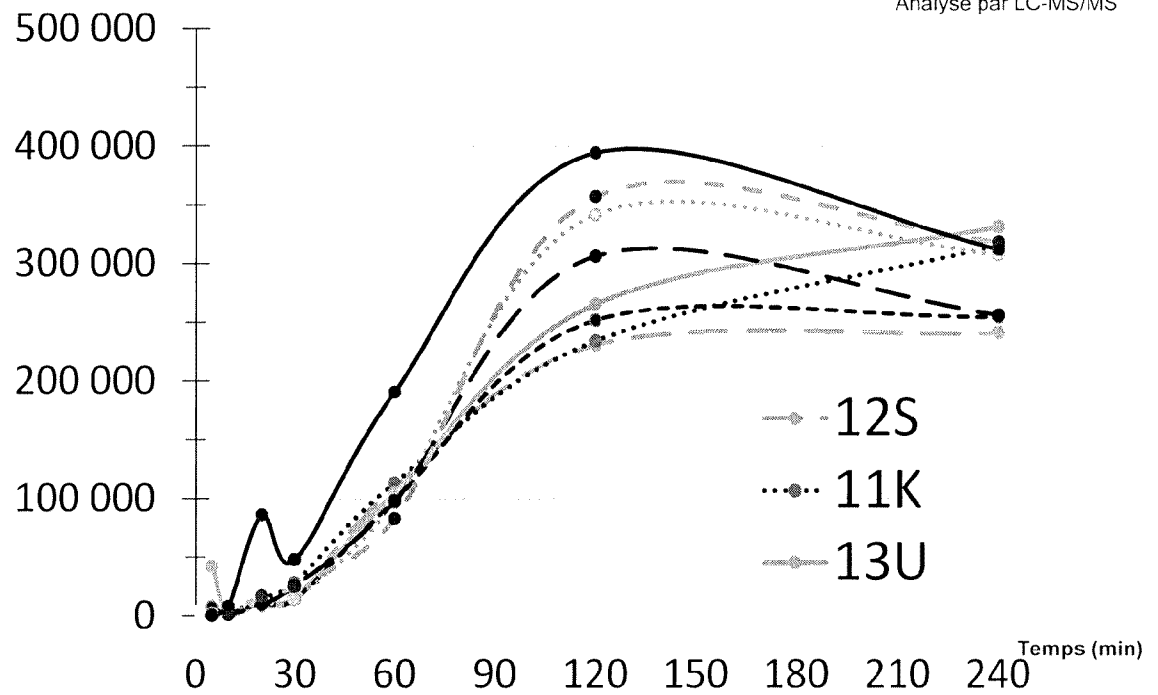


Figure 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/077506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K9/00 A61K47/12 A61K9/107 A61K31/167 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/083910 A2 (UNIV PARIS DESCARTES [FR]) 13 June 2013 (2013-06-13)	1,5, 9-11,13, 16
Y	the whole document	2-4,6-8, 12-16
Y	----- JP 2012 214412 A (KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO LTD) 8 November 2012 (2012-11-08) the whole document -----	2-4,6-8, 12-16
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 January 2018		Date of mailing of the international search report 01/02/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Raposo, Antonio

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/077506

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013083910 A2	13-06-2013	CA 2858312 A1	13-06-2013
		EP 2787976 A2	15-10-2014
		FR 2983731 A1	14-06-2013
		US 2015105426 A1	16-04-2015
		WO 2013083910 A2	13-06-2013

JP 2012214412 A	08-11-2012	JP 5855349 B2	09-02-2016
		JP 2012214412 A	08-11-2012

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/077506

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K9/00 A61K47/12 A61K9/107 A61K31/167 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2013/083910 A2 (UNIV PARIS DESCARTES [FR]) 13 juin 2013 (2013-06-13)	1,5, 9-11,13, 16
Y	le document en entier	2-4,6-8, 12-16
Y	----- JP 2012 214412 A (KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO LTD) 8 novembre 2012 (2012-11-08) le document en entier -----	2-4,6-8, 12-16
☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
24 janvier 2018	01/02/2018	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Raposo, Antonio	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/077506

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2013083910 A2	13-06-2013	CA 2858312 A1	13-06-2013
		EP 2787976 A2	15-10-2014
		FR 2983731 A1	14-06-2013
		US 2015105426 A1	16-04-2015
		WO 2013083910 A2	13-06-2013

JP 2012214412 A	08-11-2012	JP 5855349 B2	09-02-2016
		JP 2012214412 A	08-11-2012
