

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/045504 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
A61K 49/18 (2006.01) A61K 9/107 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2012/068984
- (22) Date de dépôt international :
26 septembre 2012 (26.09.2012)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
11 58565 26 septembre 2011 (26.09.2011) FR
- (71) Déposant : GUERBET [FR/FR]; 15, Rue des Vanesses,
F-93420 Villepinte (FR).
- (72) Inventeurs : ROBIC, Caroline; 68 grande rue Charles de
Gaille, F-94130 Nogent Sur Marne (FR). CHADEL,
Samy; 1, rue Jean Le Poulain, F-69740 Genas (FR).
SCHMITT, Véronique; 39 Rue Fernand Izer, Résidence
Le Prince Noir - Bâtiment E, F-33400 Talence (FR).
LEAL CALDERON, Fernando; 8 Impasse Jasmin, F-
33650 La Brede (FR). PORT, Marc; 86 rue de Verdun, F-
95170 Deuil La Barre (FR). LAMBERT, Olivier; 9 allée
du Berger, F-33170 Gradignan (FR).
- (74) Mandataires : BLOT, Philippe et al.; Cabinet Lavoix, 2,
place d'Estienne d'Orves, F-75009 Paris (FR).

- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, 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, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasienn (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,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

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



WO 2013/045504 A1

(54) Title : PERFLUORINATED NANOEMULSIONS, METHOD FOR PREPARING SAME, AND USE THEREOF AS A CONTRAST AGENT

(54) Titre : NANOEMULSIONS PERFLUORÉES, LEUR PROCÉDE DE PREPARATION, ET LEUR UTILISATION COMME AGENT DE CONTRASTE

(57) Abstract : The present application relates to an oil-in-water emulsion, including: an aqueous phase; a fluorinated oil phase; and a surfactant at the interface between the aqueous phase and the fluorinated oil phase, the surfactant being an anionic surfactant, as well as to a method for preparing same, and to the use thereof as a contrast agent.

(57) Abrégé : La présente demande concerne une nanoémulsion huile dans eau comprenant : - une phase aqueuse - une phase huile fluorée un tensioactif à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huile fluorée, le tensioactif étant un agent tensioactif anionique, son procédé de préparation et son utilisation comme agent de contraste.

NANOEMULSIONS PERFLUORÉES , LEUR PROCEDE DE PREPARATION, ET LEUR UTILISATION COMME AGENT DE CONTRASTE.

La présente invention concerne de nouvelles nanoémulsions et de nouveaux
5 procédés de préparation de nanoémulsions, et leur utilisation comme agents de
contraste notamment en IRM. Dans le domaine de l'imagerie diagnostique, un grand
nombre de recherches ont concerné des nanosystèmes lipidiques de type émulsion.
Typiquement les émulsions utilisées sont sous forme de vésicules préparées à l'aide de
constituants lipidiques (huile en particulier) et de tensioactifs (également désignés
10 surfactants) servant d'interface entre la phase aqueuse et le noyau lipidique de la
nanogouttelette. Les émulsions lipidiques huile dans eau incorporent une phase huileuse
lipophile, formant des gouttelettes en solution aqueuse.

Une catégorie particulière d'émulsions décrite notamment dans WO 03/062198
ou US 6,676,963 est celle de nanoémulsions fluorées comprenant, intégrés à l'intérieur
15 des vésicules lipidiques, des composés fluorés comportant des atomes de fluor F19
utilisés pour l'Imagerie de Résonance Magnétique IRM. En effet le fluor a notamment
l'intérêt par rapport à l'IRM du proton d'être quasiment absent en dans les systèmes
biologiques à l'état libre ce qui lui permet d'être reconnu comme une excellente sonde
quantitative sous la forme fluor F19. Le cœur est formé d'une huile fluorée, et entouré
20 d'une couche lipidique formée par un tensioactif (lécithine par exemple).

Ces émulsions fluorées peuvent comprendre en outre un nombre très élevé de
complexes de métaux paramagnétiques, en particulier de lanthanides, pour associer
l'IRM du fluor 19F et du proton 1H. On connaît ainsi des émulsions fluorées pour IRM
incorporant des chélates capables de complexer des lanthanides en particulier le
25 gadolinium. Les chélates utilisés sont notamment des dérivés du DTPA, DOTA, DO3A,
HPDO3A et autres chélates largement décrits dans l'art antérieur. Ces chélates
hydrophiles sont rendus lipophiles en leur greffant une zone lipophile telle qu'un
phospholipide, ce qui permet de les intégrer dans la membrane lipidique que forme le
tensioactif lipidique de la composition. Plusieurs milliers (5000 à 100 000 environ) de ces
30 complexes sont intégrés dans la membrane lipidique de ces vésicules, ce qui permet
d'obtenir une relaxivité (signal IRM) élevée pour une détection de la zone physiologique
étudiée et modifier le temps de relaxation du 19F. La partie hydrophile (la partie
hydrophile que représente le chélate auquel est attaché un groupe lipophile de manière
à prendre le chélate lipophile) est localisée à la surface externe des nanogouttelettes, en
35 contact avec la phase aqueuse de la solution de nanogouttelettes.

On connaît aussi des émulsions huile dans eau et non fluorées, comprenant des
chélates de lanthanides pour l'IRM uniquement du proton.

En outre, afin d'obtenir un signal spécifique de zones pathologiques, par exemple associés à une surexpression d'un marqueur de ces zones (récepteurs par exemple), des molécules de ciblage (ou biovecteurs, peptide par exemple ayant une affinité pour le récepteur) ont été greffés sur les nanogouttelettes de ces émulsions fluorées. WO
5 03/062198 décrit en particulier l'utilisation de composés peptidomimétiques pour cibler des intégrines surexprimées dans des zones tumorales. Pour l'incorporation à la membrane lipidique, les biovecteurs sont rendus lipophiles en les associant à des chaînes lipophiles.

Toutefois, malgré des avancées prometteuses, les agents de contraste fluorés et
10 le cas échéant vectorisés décrits n'ont pas encore démontré totalement leur efficacité clinique, et posent des difficultés notamment en matière de stabilité dans la durée. En particulier une durée de conservation de plus de 9 mois est difficile à atteindre, alors que la stabilité recherchée est d'au moins un an et de préférence de l'ordre de 2 à 3 ans.

Un problème technique complexe reste l'optimisation des constituants,
15 notamment l'huile et les surfactants. Il s'agit ici d'émulsions directes de type huile dans eau (H/E), dont la phase dispersée est lipophile et la phase continue hydrophile. La non miscibilité des deux phases a pour conséquence l'existence d'interface entre l'eau et l'huile, ce qui coûte de l'énergie au système. Cette énergie est quantifiée par la tension interfaciale notée γ (énergie par unité de surface). Grâce à leur double affinité, les
20 molécules amphiphiles utilisées comme tensioactif (ou surfactant) peuvent s'adsorber aux interfaces et ainsi diminuer la tension interfaciale. Les molécules amphiphiles particulièrement considérées ici sont des phospholipides.

Lorsque de l'énergie mécanique est fournie au système, la quantité d'interface
entre les deux fluides non miscibles est augmentée et l'une des deux phases est
25 fragmentée sous forme de gouttelettes. La présence des molécules amphiphiles à l'interface va ralentir le retour à la séparation de phase (voir figure 1).

Ces agents de surface peuvent être de natures différentes : tensioactif classique, polymère, phospholipide, particule... Ils induisent des répulsions stériques ou électrostatiques entre les gouttes.

30 Généralement, les stabilisants sont des tensioactifs et ne sont pas ancrées irréversiblement à l'interface. Au dessus de la concentration micellaire critique (CMC) les molécules amphiphiles s'auto-assemblent dans la phase continue et elles adoptent des formes variées fonction de plusieurs facteurs. Il existe alors un équilibre dynamique avec échange continu entre les molécules adsorbées à l'interface et en excès dans la phase
35 continue.

Il existe deux mécanismes de destruction des émulsions (déstabilisation irréversible) qui font évoluer le système vers la séparation macroscopique des phases. Ces deux instabilités sont la coalescence et le mûrissement d'Ostwald.

La coalescence correspond à la rupture du film de surfactants séparant deux
5 gouttes en contact, entraînant ainsi la fusion de celles-ci (Voir figure 2).

Le mûrissement d'Ostwald est dû au transfert de la phase dispersée à travers la phase continue, des petites gouttes vers les plus grosses sous l'effet de leur différence de pression interne : la pression dans les gouttes est en effet d'autant plus grande que leur rayon est faible (loi de Laplace : $P_{Laplace} = 2\gamma/R$). Ce transfert a lieu afin d'égaliser
10 les pressions internes (Voir figure 3).

Le mûrissement d'Ostwald domine pour les gouttes de petite taille tandis que la coalescence est le mécanisme majoritaire pour les gouttes de grande taille. Lors de la déstabilisation de la nanoémulsion, l'augmentation de la taille des gouttes s'accompagne d'une diminution de la quantité d'interface eau-huile S : ($S=6V/D$), où V est le volume
15 d'huile et D le diamètre des gouttelettes et d'une désorption du stabilisant.

Dans une émulsion, les deux mécanismes de déstabilisation ont lieu, avec mûrissement d'Ostwald puis coalescence au cours du temps.

L'objectif est de réaliser des nanoémulsions directes stables dans le temps, dont les interfaces sont recouvertes par un mélange de phospholipides naturels (PL) et de
20 phospholipides modifiés (PLM).

Le demandeur a réussi à obtenir des nanoémulsions comprenant des gouttelettes le cas échéant vectorisées :

- suffisamment stables pour être produites et conservées une longue durée (plusieurs mois à plusieurs années), en particulier en limitant les problèmes de
25 coalescence des gouttelettes lipidiques entre elles
- suffisamment stables in vivo pour ne pas être dégradées
- adaptées sur le plan de la pharmacocinétique
- suffisamment efficaces en terme de signal pour l'imagerie clinique (IRM en particulier) chez le patient.

30 A cet effet, la demande fournit des nanoémulsions huile dans l'eau comprenant une phase aqueuse et une phase huile fluorée.

Au sens de la présente demande, par « nanoémulsion », on entend que la taille des gouttelettes est comprise entre 1 et 1000 nm. La taille des gouttelettes est typiquement de 50 à 400 nm, avantageusement 100 à 350 nm, notamment 150 à 300 nm, en
35 particulier 200 à 250 nm. Les gouttelettes sont également appelées « gouttes » ci-après. Les gouttelettes ont une taille suffisamment petite pour leur permettre de circuler dans les milieux biologiques sans dégradation du produit. La taille des gouttelettes peut être

mesurée par spectroscopie par corrélation de photons (PCS pour "photon correlation spectroscopy" en anglais).

5 Dans les nanoémulsions selon l'invention, la phase aqueuse est avantageusement de l'eau ou une solution aqueuse pharmaceutiquement acceptable telle qu'une solution saline, une solution tampon. La phase aqueuse pourra par exemple être de l'eau comprenant de 1 à 4%, préférentiellement de 2 à 3%, encore plus préférentiellement 2,5% en poids de glycérol par rapport au poids de la phase aqueuse.

10 Dans les nanoémulsions selon l'invention, pour la phase huile fluorée, toute huile fluorée appropriée peut être utilisée, en particulier les huiles fluorées déjà utilisées en imagerie médicale. L'huile fluorée est notamment un huile choisie parmi les huiles incluant des perfluorocarbone linéaires ou ramifiés, ou cycliques ou polycycliques, saturés ou insaturés, des amines tertiaires cycliques perfluorées, des perfluoro esters ou thioesters, des haloperfluorocarbone et composés connus analogues ou dérivés.

15 Avantageusement au moins 60% des atomes d'hydrogène de l'huile hydrocarbonée correspondante sont remplacés par un atome de fluor. Typiquement ces huiles fluorées sont des chaînes de 2 à 16 atomes, perfluoroalkanes, bis(perfluoroalkyle)alcènes, perfluoréthers, perfluoroamines, perfluoroalkyle bromures, perfluoroalkyle chlorures.

20 Selon des réalisations avantageuses, la nanogouttelette lipidique inclut des perfluorocarbone tels que décrits dans US 5,958,371, la nanoémulsion liquide contenant des nanogouttelettes comportant un perfluorocarbone à point d'ébullition assez élevé (par exemple entre 30 et 150 °C, de préférence entre 50 et 150°C) entouré d'un revêtement composé d'un lipide et/ou d'un surfactant.

25 Les huiles perfluorées pour nanoémulsions de perfluorocarbone pour imagerie IRM sont rappelées notamment dans les documents US 6,676,963, US 4,927,623, US 5,077,036, US 5,114,703, US 5,171,755, US 5,304,325, US 5,350,571, US 5,393,524, US 5,403,575 ; notamment les huiles : perfluorooctylbromide PFOB, C₈F₁₇Br (PFOB ou perfluorobron), perfluorooctyléthane (C₈F₁₇G₂H₅ PFOE), perfluorodecalin FDC, perfluorooctane C₈F₁₈, perfluorodichlorooctane, bromure de perfluoro-n-octyl, 30 perfluoroheptane, perfluorodécane C₁₀F₂₂, perfluorododécyle bromide C₁₀F₂₂Br PFDB, perfluorocyclohexane, perfluoromorpholine, perfluorotripropylamine, perfluorotributylamine, perfluorodiméthylcyclohexane, perfluorotriméthylcyclohexane, ester de perfluorodicyclohexyl, perfluoro-n-butyltétrahydrofurane.

35 On inclut dans la définition des huiles fluorées les huiles de formule C_n F_{2n+1} X, X C_n F_{2n} X, où n est un nombre entier variant de 2 à 10, X = Br, Cl ou I notamment : 1bromo-F-butane (n-C₄ F₉ Br), 1-bromo-F-hexane (n-C₆ F₁₃ Br), 1-bromo-F-heptane (n-C₇ F₁₅ Br), 1,4-dibromo-F-butane et 1,6-dibromo-F-hexane.

On inclut aussi des composés fluorés avec des substituants chlorés par exemple: perfluorooctyl chloride ($n\text{-C}_8\text{F}_{17}\text{Cl}$), 1,8-dichloro-F-octane ($n\text{-Cl C}_8\text{F}_{16}\text{Cl}$), 1,6-dichloro-F-hexane ($n\text{-ClC}_6\text{F}_{12}\text{Cl}$), et 1,4-dichloro-F-butane ($n\text{-Cl C}_4\text{F}_8\text{Cl}$).

On inclut aussi les huiles fluorées de formule $\text{C}_n\text{F}_{2n+1}\text{OC}_m\text{F}_{2m+1}$, $\text{C}_n\text{F}_{2n+1}\text{CH}=\text{CHC}_m\text{F}_{2m+1}$, par exemple : $\text{C}_4\text{F}_9\text{CH}=\text{CHC}_4\text{F}_9$ (F-44E), $i\text{-C}_3\text{F}_9\text{CH}=\text{CHC}_6\text{F}_{13}$ (F-i36E), $\text{C}_6\text{F}_{13}\text{CH}=\text{CHC}_6\text{F}_{13}$ (F-66E) où n et m sont identiques ou différentes, et sont des entiers compris entre 2 et 12.

On inclut aussi des composés polycycliques ou cycliques tels que : $\text{C}_{10}\text{F}_{18}$ (F-decalin ou perfluorodecalin), et des mélanges de perfluoroperhydrophenanthrene et de perfluoro n-butyldecalin.

On inclut aussi des amines perfluorées, telles que : F-triethylamine ("FTP"), F-tributylamine ("FTBA"), F-4-methyloctahydroquinolizine ("FMOQ"), F-N-methyl-decahydroisoquinoline ("FMIQ"), F-N-methyldecahydroquinoline ("FHQ"), F-N-cyclohexylpyrrolidine ("FCHP"), F-2-butyltetrahydrofuran ("FC-75" or "FC-77").

15

Le tensioactif de la nanoémulsion selon l'invention est un agent tensioactif anionique. Ainsi, l'invention concerne une nanoémulsion huile dans eau, notamment pour IRM, comprenant :

- une phase aqueuse
- une phase huile fluorée
- un tensioactif à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huile fluorée, le tensioactif étant un agent tensioactif anionique.

20

Le demandeur a en effet constaté que l'utilisation d'au moins un agent tensioactif anionique (dont la partie hydrophile est chargée négativement, typiquement par un groupe carboxylate ou sulfonate) permet d'augmenter la stabilité de la nanoémulsion.

Le tensioactif anionique est choisi parmi les tensioactifs connus et utilisables selon la Pharmacopée, notamment le SDS (dodécyle sulfate de sodium).

30

Dans un mode de réalisation, le tensioactif anionique est un acide gras.

Le pH de la phase aqueuse continue est choisi de manière que la fonction acide carboxylique de l'acide gras soit sous forme de carboxylate, en tenant compte des pKa des fonctions acide carboxylique des acides gras (généralement entre 4 et 5). L'homme du métier est à même d'ajuster le pH de la phase aqueuse continue en ce sens. La phase aqueuse continue a généralement un pH de l'ordre de 7.

35

On entend par le terme « acide gras » désigner des acides carboxyliques aliphatiques présentant une chaîne carbonée d'au moins 6 atomes de carbone. Les acides gras naturels possèdent une chaîne carbonée de 4 à 28 atomes de carbone (généralement un nombre pair). On parle d' « acide gras à longue chaîne » pour une longueur de 14 à 22 carbones et « à très longue chaîne », s'il y a plus de 22 carbones. On parle au contraire d' « acide gras à courte chaîne » pour une longueur de 6 à 10 carbones, en particulier 8 ou 10 atomes de carbone. L'homme du métier connaît la nomenclature associée et en particulier utilise :

- C_n-C_p pour désigner une fourchette d'acides gras en C_n à C_p
- 10 - et C_n+C_p, le total des acides gras en C_n et des acides gras en C_p

Par exemple :

- les acides gras entre 14 et 18 atomes de carbone s'écrivent acides gras en C14-C18
- le total des acides gras en C16 et des acides gras en C18 s'écrit C16 +C18

De préférence, l'agent tensioactif anionique peut être un acide gras insaturé, préférentiellement monoinsaturé, notamment en C16-C24, avantageusement en C16-C18, encore plus avantageusement en C18, en particulier l'acide oléique (sous forme de carboxylate).

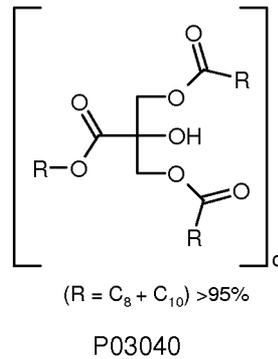
La nanoémulsion comprend typiquement de 0,05 à 5% de tensioactif anionique, notamment de 0,2 à 3% de tensioactif anionique, en particulier 0,25, 0,5, 1, 1,1 ou 2% de tensioactif anionique (par exemple d'acide oléique), par rapport au poids total de l'huile fluorée.

Dans un mode de réalisation, la dite nanoémulsion comprend en outre un agent compatibilisant formant une couche supplémentaire s'intercalant entre la phase huile fluorée et la couche de tensioactif.

Selon des réalisations préférées, l'agent compatibilisant est une huile hydrocarbonée (non fluorée) comprenant au moins 70%, avantageusement au moins 80%, de façon avantageuse au moins 95% en poids, notamment au moins 97 %, d'acides gras saturés en C6-C18, avantageusement en C6-C14, plus avantageusement en C6-C10.

Très avantageusement, l'huile hydrocarbonée comprend moins de 10%, de préférence moins de 5% d'acides gras insaturés, en particulier moins de 5%, et de préférence moins de 2%, moins de 1% d'acides gras insaturés en C14-C18 ou en C14-C22.

Par exemple l'huile est le MIGLYOL[®],



ou l'un des ses dérivés connus, par exemple le MIGLYOL[®] 810 ou MIGLYOL[®] 812 (caprylic/capric triglyceride), MIGLYOL[®] 818 (caprylic/capric/linoleic triglyceride), le MIGLYOL[®] 612 (glyceryl trihexanoate), d'autres dérivés MIGLYOL[®] propylène glycol dicaprylate dicaprâte.

Par exemple le Miglyol[®] 812 a la composition suivante :

- Acide Caproïque (C₆₋₀) : max 2 %
- Acide Caprylique (C₈₋₀) : 50 à 65 %
- Acide Caprique (C₁₀₋₀) : 30 à 45 %
- Acide Laurique (C₁₂₋₀) : max 2 %
- Acide Miristique (C₁₄₋₀) : max 1 %
- Acide Linoléique (C₁₈₋₂) : -

Selon des variantes, l'huile hydrocarbonée saturée est un mélange d'huiles saturées comprenant chacune au moins 70%, de préférence au moins 80, 90, 95% d'acides gras saturés de 6 à 10 atomes de carbone.

Selon des réalisations, l'huile hydrocarbonée saturée est une huile saturée comprenant au moins 70%, de préférence au moins 80, 90, 95% d'acides gras saturés de 12 à 18 atomes de carbone, ou comprenant un mélange d'huiles saturées comprenant chacune au moins 70%, de préférence au moins 80, 90, 95% d'acides gras saturés de 12 à 18 atomes de carbone.

De préférence, les acides gras saturés des huiles saturées utilisées par le demandeur sont utilisés sous forme de mono, di ou triglycérides, de préférence triglycérides.

De manière préférée, l'huile hydrocarbonée des nanoémulsions du demandeur comprend des acides gras saturés dans les variantes suivantes :

- C6-C18 > 70%, de préférence C6-C18 > 80% de préférence C6-C18 >95%, et encore de préférence C6-C18 > 98%
- C6-C14 > 70%, de préférence C6-C14 > 80% de préférence C6-C14 >95%, et encore de préférence C6-C14 > 98%
- C8+C10 > 70%, de préférence C8+C10 > 80% de préférence C8+C10 >95%, et

encore de préférence C8+C10 > 98%

- C8 compris entre 40 et 70% de préférence 50 à 65% et/ou C10 compris entre 20 et 50% de préférence 30 à 45%, le total C8+C10 étant supérieur à 80%.

5 Par souci de simplification, il est indiqué que la nanoémulsion comprend un tensioactif. Il est clair pour l'homme du métier qu'il s'agit d'au moins un tensioactif (par exemple un mélange de tensioactifs) formant une couche de tensioactif entre la phase huileuse et la phase aqueuse, et désigné également « tensioactifs totaux » dans la demande. Par exemple, la nanoémulsion peut comprendre un tensioactif anionique et un
10 lipide amphiphile, et/ou un lipide pégylé tels que définis ci-après.

Le tensioactif comprend généralement un ou plusieurs lipides amphiphiles, qui comportent une partie hydrophile et une partie lipophile. Ils sont généralement choisis parmi les composés dont la partie lipophile comprend une chaîne saturée ou insaturée,
15 linéaire ou ramifiée, ayant de 8 à 30 atomes de carbone.

Avantageusement le lipide amphiphile est un phospholipide, de préférence choisi parmi : phosphatidylcholine dioléoylphosphatidylcholine, dimyristoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, distéaroylphosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, sphingomyéline, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol. La
20 lécithine est un lipide amphiphile préféré. Le Lipoïde, par exemple E80 est aussi un lipide préféré. Le lipide amphiphile peut aussi être choisi aussi parmi les cholestérols, les lysolipides, les sphingomyélines, les tocophérols, les glucolipides, stéarylamines, les cardiolipines d'origine naturelle ou synthétique ; les molécules composées d'un acide gras couplé à un groupement hydrophile par une fonction éther ou ester tels que les
25 esters de sorbitan comme par exemple les monooléate et monolaurate de sorbitan ; les lipides polymérisés ; les esters de sucre tels que les mono-et di-laurate, mono- et di-palmitate, mono- et distéarate de saccharose; lesdits lipides amphiphiles pouvant être utilisés seuls ou en mélanges.

Avantageusement le lipide amphiphile est un lipoïde, notamment le lipoïde E80.

30 Selon un mode de réalisation particulier, tout ou partie du lipide amphiphile peut posséder une fonction réactive, telle qu'un groupe maléimide, thiol, amine, ester, oxyamine ou aldéhyde. La présence de fonctions réactives permet le greffage de composés fonctionnels au niveau de l'interface entre les nanogouttelettes et la phase aqueuse continue.

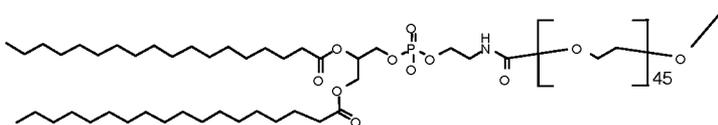
35

On pourra utiliser pour la couche de tensioactif, en plus du lipide amphiphile, de manière non obligatoire, et en particulier afin d'agir sur le caractère furtif du produit dans

l'organisme, des lipides pégylés c'est-à-dire porteurs de groupes oxyde de polyéthylène (PEG), tels que le polyéthylèneglycol/phosphatidyl-éthanolamine (PEG-PE). Par « polyéthylèneglycol » PEG, au sens de la présente demande, on désigne de façon générale, des composés comprenant une chaîne $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_k-\text{CH}_2\text{OR}_3$ dans laquelle k varie de 2 à 100 (par exemple 2, 4, 6, 10, 50), et R3 est choisi parmi H, alkyle ou $-(\text{CO})\text{Alk}$, le terme "alkyle" ou "alk" désignant un groupe aliphatique hydrocarboné, linéaire ou ramifié, ayant environ de 1 à 6 atomes de carbone dans la chaîne. Le terme « polyéthylèneglycol » tel qu'employé ici englobe notamment les composés aminopolyéthylèneglycols, tels que des DSPE-PEG (DSPE : Distéaroyle phosphatidyle éthanolamine). On citera notamment les PEG 350, 750, 2000, 3000, 5000, modifiés par ajout de groupements amphiphiles pour s'insérer au sein de la couche de tensioactif de la nanogouttelette, notamment :

- 1,2-Distéaroyle-sn-Glycero-3-Phosphoéthanolamine-N-[Méthoxy(Polyéthylène glycol)-350]
- 1,2-Distéaroyle-sn-Glycero-3-Phosphoéthanolamine-N-[Méthoxy(Polyéthylène glycol)-550],
- 1,2-Distéaroyle-sn-Glycero-3-Phosphoéthanolamine-N-[Méthoxy(Polyéthylène glycol)-750]

On utilisera notamment le lipide pégylé :



Dans un mode de réalisation préféré, le tensioactif comprend un mélange de lipoïde (lipide amphiphile) et de DSPE-PEG (lipide pégylé), en particulier de Lipoïd E80 et de DSPE-PEG 2000.

25

Avantageusement la couche de tensioactif inclut au moins un ligand de ciblage amphiphile d'une zone physiologique (également appelé biovecteur), le ligand de ciblage amphiphile représentant 0,1 à 10% en mole du total de la couche de tensioactif, avantageusement 0.05 à 5%, notamment 1 à 2 %.

30

Les gouttelettes des nanoémulsions comprennent typiquement chacune un nombre de ligands de ciblage amphiphile de l'ordre de 100 à 5000, notamment 500 à 2000, ce qui permet le ciblage efficace selon l'affinité et la multivalence du ligand de ciblage.

Selon des réalisations très avantageuses, la nanoémulsion huile dans eau comprend :

- une phase aqueuse, représentant de préférence 29.3 à 80 % en poids de la composition, avantageusement 55 à 65%, plus avantageusement de 58 à 62%,
- 5 - une phase fluorée comprenant au moins une huile fluorée, représentant 19.3 à 70% en poids de la composition, avantageusement 35 à 45%, plus avantageusement 37 à 42%,
- un tensioactif (formant la couche de tensioactif) à l'interface entre les phases aqueuse et fluorée,
- 10 - un agent compatibilisant formant une couche entre la phase huile fluorée et la couche de tensioactif,
- la teneur totale en tensioactif en poids par rapport à l'huile étant comprise entre 3 et 15%, avantageusement entre 6 et 12 % ;
- la teneur totale en tensioactif en poids par rapport à la composition étant comprise
15 entre 0.6 et 10 %, avantageusement entre 1 et 3 % ;
- la teneur totale en agent compatibilisant étant comprise entre 0.1 % et 5% massique par rapport à la phase aqueuse.

De manière particulièrement avantageuse, les nanoémulsions du demandeur
20 huile dans eau, notamment pour IRM, comprennent :

- une phase aqueuse
- une phase huile fluorée
- un tensioactif à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huile fluorée,
la phase fluorée comprenant une première huile fluorée et au moins une deuxième huile
25 fluorée.

Le demandeur a en effet constaté qu'un mélange d'huiles fluorées permet d'augmenter la stabilité de la nanoémulsion. Avantageusement la première huile fluorée représente entre 70 et 95% massique de la phase huile fluorée et la deuxième huile fluorée représente 5 à 30% massique de la phase huile fluorée.

30 Avantageusement les huiles fluorées sont choisies parmi les huiles fluorées décrites dans la présente demande.

De préférence, la deuxième huile fluorée est une huile de plus longue chaîne moléculaire que la première huile fluorée (c'est-à-dire comprenant plus d'atomes de carbone, et dont la masse moléculaire est généralement plus élevée).

35 Très avantageusement, la première huile fluorée est le PFOB, la deuxième huile fluorée est une huile de plus longue chaîne moléculaire, de préférence le

perfluorohexadécane PFHD ou le perfluorodécylbromide PFDB. Par exemple le ratio est 10% massique en PFHD ou PFDB et de 90% massique en PFOB.

Ce mode de réalisation est avantageux notamment dans le cas des nanoémulsions décrites dans la demande qui comprennent un agent compatibilisant formant couche entre la phase huile fluorée et la couche de tensioactif. L'invention concerne ainsi selon une réalisation une nanoémulsion huile dans eau, notamment pour IRM, comprenant :

- une phase aqueuse
 - une phase huile fluorée
 - 10 - un tensioactif à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huile fluorée, le tensioactif formant une couche de tensioactif entre la phase aqueuse et la phase huile fluorée,
 - la dite nanoémulsion comprenant en outre un agent compatibilisant formant une couche supplémentaire s'intercalant entre la phase huile fluorée et la couche de
 - 15 tensioactif,
- la phase fluorée comprenant une première huile fluorée et au moins une deuxième huile fluorée.

Selon un autre aspect, l'invention concerne une nanoémulsion huile dans eau pour IRM comprenant :

- une phase aqueuse
- une phase huile fluorée
- un tensioactif à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huile fluorée,
- la dite nanoémulsion comprenant en outre au moins agent stabilisant choisi parmi
- 25 les protéines et les polysaccharides, de préférence les protéines.

Le demandeur a en effet constaté que l'utilisation d'au moins une protéine ou d'un polysaccharide permet d'augmenter la stabilité de la nanoémulsion. La protéine est choisie parmi les protéines connues et utilisables selon la Pharmacopée, notamment la caséine ou la lactoglobuline et préférentiellement la lactoglobuline. Le polysaccharide est de préférence l'amidon. De préférence la protéine ou le polysaccharide est utilisée en

30 proportion compris entre 0.1 à 5% massique par rapport à la phase aqueuse.

Dans un mode de réalisation, la nanoémulsion comprend un agent compatibilisant tel que défini ci-dessus.

Dans un mode de réalisation, la phase huileuse de la nanoémulsion comprend

35 une première huile fluorée et au moins une deuxième huile fluorée.

Dans un mode de réalisation, la nanoémulsion comprend un agent compatibilisant tel que défini ci-dessus et la phase huileuse de la nanoémulsion comprend une première huile fluorée et au moins une deuxième huile fluorée.

5 Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé de préparation d'émulsions huile dans eau, notamment pour IRM, comprenant une phase aqueuse, une phase huile fluorée, un tensioactif à l'interface entre les phases aqueuse et lipidique, le procédé comprenant les étapes :

- a) mélange des constituants de la phase aqueuse, de la phase fluorée, et du
10 tensioactif, de manière à obtenir une nanoémulsion
- b) au moins une étape de lavage de la nanoémulsion préparée en a).

Dans des réalisations, lors de l'étape de lavage, la nanoémulsion est centrifugée afin de séparer les gouttelettes de la phase continue. L'huile étant plus lourde que l'eau, les gouttes constituent le sous-nageant opaque et visqueux, tandis que la phase
15 continue contenant l'eau et les phospholipides forment le surnageant. Ce surnageant est remplacé par une phase continue (eau ou eau salée) sans phospholipides.

Selon un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une nanoémulsion telle que définie ci-dessus ou d'une nanoémulsion susceptible d'être obtenue par le procédé
20 tel que défini ci-dessus comme agent de contraste, notamment pour une détection par imagerie par résonance magnétique (IRM).

L'invention concerne également un agent de contraste comprenant une nanoémulsion telle que définie ci-dessus ou une nanoémulsion susceptible d'être
obtenue par le procédé tel que défini ci-dessus.

25

Les figures annexées représentent respectivement :

Figure 1 : Coupe d'une goutte d'huile stabilisée par des tensioactifs

Figure 2 : schéma représentant le mécanisme de la coalescence

Figure 3 : schéma représentant le mûrissement d'Ostwald

30 Figure 4: taille en nm des gouttelettes dans le régime pauvre (3% mass.) dans l'eau pure en fonction du temps en jours (exemple II. 1)

Figure 5 : taille en nm des gouttelettes dans le régime riche (12% mass.) dans l'eau pure en fonction du temps en jours (exemple II. 1)

35 Figure 6: taille en nm des gouttelettes comprenant du des tensioactifs anioniques (losange), cationiques (triangles) et non-ionique (carrés) de chaînes carbonés C12, dans l'eau pure en fonction du temps en jours (exemple II. 2)

Les exemples qui suivent illustrent les modes de réalisation de l'invention.

PARTIE I : Fabrication et méthode de caractérisation des nanoémulsions

5 1. Composés utilisés

Les produits utilisés pour formuler les nanoémulsions sont les suivants :

- Phases dispersées : (Huiles fluorées) : perfluorooctylbromide (*PFOB*).
- Phases continues : Eau distillée ou eau salée (NaCl=0,154M) ou eau additionnée de 2,5% en poids de glycérol (pH 7).
- 10 - Stabilisants : Le Phospholipide naturel *Lipoid E80* (PL) issu du jaune d'œuf, composé majoritairement de Phosphatidylcholine ainsi que le phospholipide modifié pégylé *DSPE-PEG 2000* (PLM). Cette modification du phospholipide apporte de la furtivité à la nanoémulsion, pour que la nanoémulsion ne soit pas immédiatement évacuée par le système immunitaire.
- 15 - Tensioactif anionique : Acide oléique ou SDS

2. Fabrication et caractérisation des nanoémulsions

- Les phospholipides (PL) et phospholipides modifiés (PLM) et le tensioactif anionique sont dissous sous agitation magnétique et chauffage (45°C) dans la phase continue contenant l'eau pure ou l'eau salée. Dans un premier temps, une nanoémulsion dite grossière est formée en incorporant progressivement l'huile dans la phase aqueuse sous forte agitation à l'aide de l'Ultra-Turrax. Cette pré-émulsion est ensuite passée au microfluidiseur afin de diminuer la taille des gouttes. La taille moyenne des gouttes d_h ainsi qu'un indicateur de la largeur de distribution des tailles de goutte (PDI) sont mesurés par la diffusion dynamique de la lumière.
- 20
- 25

Les nanoémulsions suivantes ont été préparées :

| Références | Huile fluorée (PFOB)* | Phase aqueuse (eau pure sauf pour la dernière nanoémulsion SC*) | Tensioactif anionique (acide oléique) ** | Agent compatibilisant (Mygliol) ** | Ratio du mélange molaire de | |
|------------------|-----------------------|---|--|------------------------------------|--|------|
| | | | | | Lipide amphiphile (Lipoide E80) et de Lipide PEGylé (DSPE-PEG) | |
| | | | | | 97:3 | 95:5 |
| SC166-F1 (comp.) | 20% | Jusque 80% | - | 0,425% | 3% | - |
| SC161-F1 | 20% | Jusque 80% | 0,25% | - | 3% | - |
| SC67-F1 (comp.) | 20% | Jusque 80% | - | - | 3% | - |
| SC167-F1 (comp.) | 20% | Jusque 80% | - | 0,85% | 3% | - |
| SC162-F1 | 20% | Jusque 80% | 0,5% | - | 3% | - |
| SC164-F1 | 20% | Jusque 80% | 1% | - | 12% | - |
| SC165-F1 | 20% | Jusque 80% | 2% | - | 12% | - |
| SC31-F2 (comp.) | 20% | Jusque 80% | - | - | 12% | - |
| SC | 20% | Eau additionnée de 2,5% en poids de glycérol | 1,1% | - | - | 3% |

* % massique par rapport au poids de la composition

** % massique par rapport au poids de l'huile fluorée (PFOB en l'occurrence)

5 Tableau 1 : composition des nanoémulsions des figures 4 et 5

Les nanoémulsions suivantes ont été préparées (les pourcentages étant exprimés en poids par rapport à la CMC (concentration micellaire critique)):

| Référence | SC124-F1 | SC125-F1 (comp.) | SC126-F1 (comp.) |
|---|-------------|---------------------|---------------------|
| Huile fluorée (PFOB) | 20% | | |
| Phase aqueuse (Eau pure) | Jusque 100% | | |
| Tensioactif anionique (SDS) | 10*CMC | - | - |
| Tensioactif cationique (DTAB) | - | 10*CMC | - |
| Tensioactif non-ionique (IFRALAN 10) | - | - | 10*CMC |

5 Tableau 2 : composition des nanoémulsions de la figure 6

« Comp. » Signifie que l'exemple est comparatif

10 La taille des nanoémulsions a été mesurée par spectroscopie par corrélation de photons (PCS pour "photon correlation spectroscopy" en anglais) à l'aide d'un analyseur granulométrique Zetasizer NanoS (société Malvern).

15 Les particules de la nanoémulsion SC (dernière ligne du tableau 1) avaient une taille moyenne de 190 nm. A 114 jours après leur fabrication, cette taille était de 223 nm. A 191 jours, elle était de 175 nm. Ces résultats démontrent donc qu'une nanoémulsion selon l'invention est bien stable dans le temps.

PARTIE II : Amélioration de la stabilité des nanoémulsions

20 II.1) Ajout d'un compatibilisant

Lors de cet étude, l'amélioration de la compatibilité entre le système PL et PLM et l'interface dispersée fluorée a été recherchée.

D'après les figures 4 et 5, on remarque que l'ajout d'un compatibilisant en particulier le Miglyol, améliore la stabilité de la nanoémulsion, lorsqu'on compare avec le système de référence (SC67-F1 ou SC31-F2).

5 II.2) Charge de l'interface : utilisation de tensioactifs

Afin d'orienter les études vers le type de stabilisant le plus approprié, les phospholipides PL et PLM ont été remplacés par des tensioactifs anioniques (losange), cationiques (triangles) et non-ionique (carrés) de chaînes carbonés C12 (figure 6). Les
10 résultats montrent que les tensioactifs anioniques sont ceux qui stabilisent le mieux la nanoémulsion. Les tensioactifs non-ioniques et cationiques ne restent pas à l'interface et la nanoémulsion se déstabilise très vite.

REVENDICATIONS

1. Nanoémulsion huile dans eau comprenant :

- une phase aqueuse,
- 5 - une phase huile fluorée,
- un tensioactif à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huile fluorée, le tensioactif étant un agent tensioactif anionique.

2. Nanoémulsion selon la revendication 1, dans laquelle le tensioactif anionique
10 comprend un groupe carboxylate ou sulfonate.

3. Nanoémulsion selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le tensioactif anionique est un acide gras.

15 4. Nanoémulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle le tensioactif anionique est un acide gras insaturé, préférentiellement monoinsaturé, notamment en C16-C24, avantageusement en C16-C18, encore plus avantageusement en C18.

20 5. Nanoémulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle le tensioactif anionique est l'acide oléique.

6. Nanoémulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant un lipide amphiphile, notamment un phospholipide, tel que le lipide E80.

25

7. Nanoémulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comprenant un lipide pégylé, notamment un lipide aminopolyéthylèneglycol, tel que de la distéaroyl phosphatidyle éthanolamine.

30 8. Nanoémulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, comprenant un agent compatibilisant formant une couche supplémentaire s'intercalant entre la phase huile fluorée et la couche de tensioactif, l'agent compatibilisant étant une huile hydrocarbonée non fluorée comprenant au moins 70%, avantageusement au moins 80%, de façon avantageuse au moins 95% en poids, notamment au moins 97 %, d'acides gras saturés en C6-C18.
35

9. Nanoémulsion selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'agent compatibilisant est une huile hydrocarbonée non fluorée comprenant au moins 70% d'acides gras saturés en C6-C14, plus avantageusement en C6-C10.

5 10. Nanoémulsion selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'huile hydrocarbonée saturée est une huile saturée comprenant au moins 70%, de préférence au moins 80, 90, 95% d'acides gras saturés de 12 à 18 atomes de carbone, ou comprenant un mélange d'huiles saturées comprenant chacune au moins 70%, de préférence au moins 80, 90, 95% d'acides gras saturés de 12 à 18 atomes de carbone.

10

11. Nanoémulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que l'huile fluorée est une huile choisie parmi les huiles incluant des perfluorocarbones linéaires ou ramifiés, ou cycliques ou polycycliques, saturés ou insaturés, des amines tertiaires cycliques perfluorées, des perfluoro esters ou thioesters, 15 des haloperfluorocarbones ; avantageusement perfluorooctylbromide PFOB, $C_8F_{17}Br$ (PFOB ou perfluorobron), perfluorooctyléthane ($C_8F_{17}C_2H_5$ PFOE), perfluorodecalin FDC, perfluorooctane C_8F_{18} , perfluorodichlorooctane, bromure de perfluoro-n-octyl, perfluoroheptane, perfluorodécane $C_{10}F_{22}$, perfluorododécyle bromide $C_{10}F_{22}Br$ PFDB, perfluorocyclohexane, perfluoromorpholine, perfluorotripropylamine, 20 perfluorotributylamine, perfluorodiméthylcyclohexane, perfluorotriméthylcyclohexane, ester de perfluorodicyclohexyl, perfluoro-n- butyltétrahydrofurane.

12. Nanoémulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la phase fluorée comprend une première huile fluorée et au 25 moins une deuxième huile fluorée ; avantageusement la première huile fluorée représente entre 70 et 95% massique de la phase huile fluorée et la deuxième huile fluorée représente 5 à 30% massique de la phase huile fluorée.

13. Nanoémulsion selon la revendication 12, caractérisée en ce que la première 30 huile fluorée est le PFOB, la deuxième huile fluorée est une huile de plus longue chaîne moléculaire, de préférence le perfluorohexadécane PFHD ou le perfluorodécylbromide PFDB.

14. Procédé de préparation de nanoémulsions huile dans eau selon l'une 35 quelconque des revendications 1 à 13 comprenant une phase aqueuse, une phase huile fluorée, un tensioactif à l'interface entre les phases aqueuse et lipidique, le procédé comprenant les étapes :

- a) mélange des constituants de la phase aqueuse, de la phase fluorée, et du tensioactif, de manière à obtenir une nanoémulsion
 - b) au moins une étape de lavage de la nanoémulsion préparée en a).
- 5 15. Agent de contraste comprenant une nanoémulsion selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou une nanoémulsion susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 14.

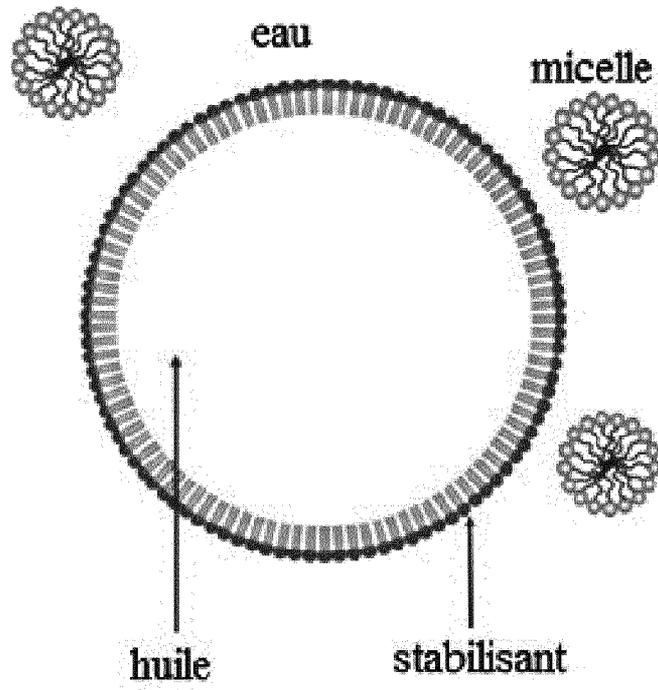


FIG.1

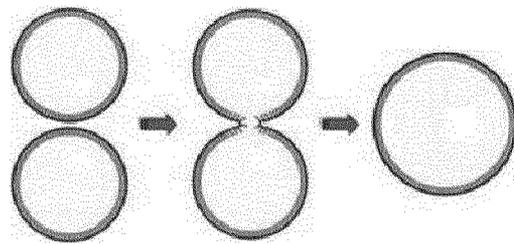


FIG.2

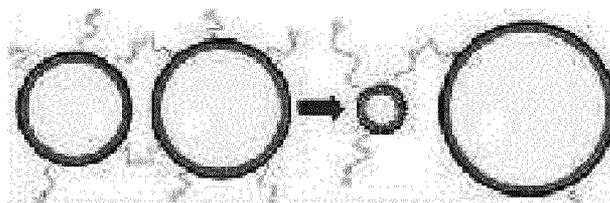


FIG.3

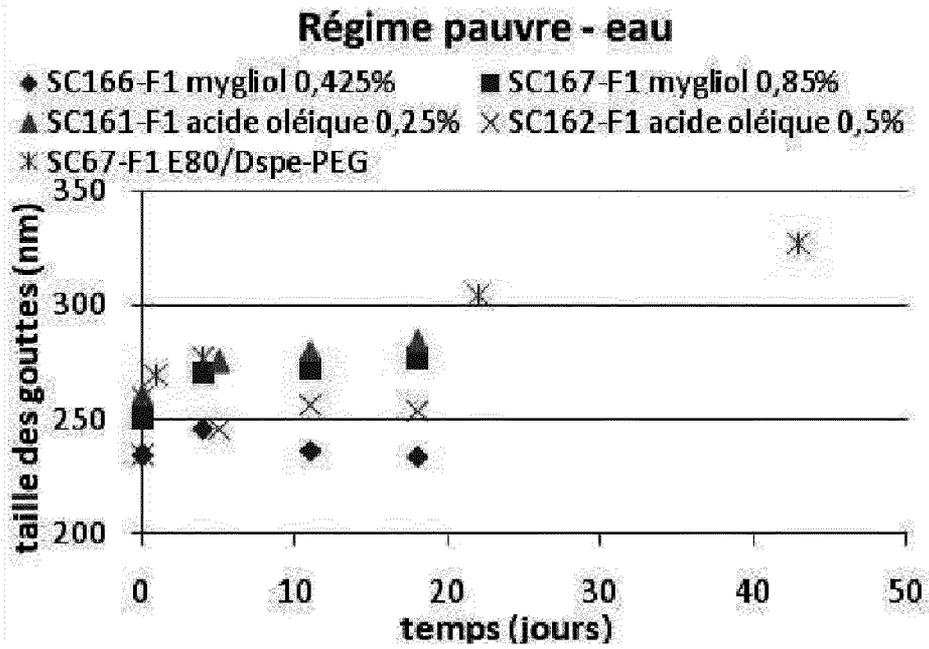


FIG.4

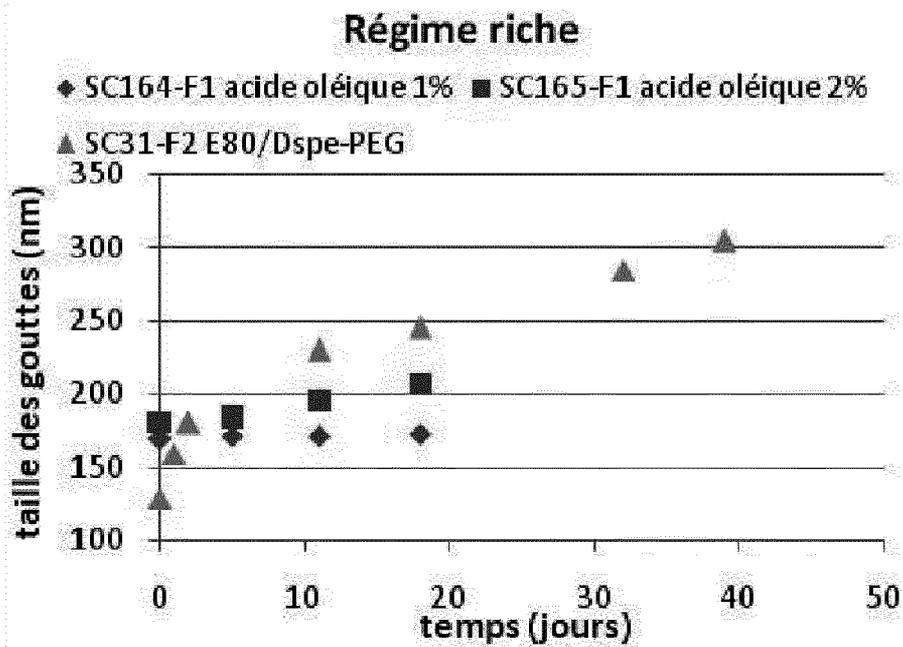


FIG.5

3/3

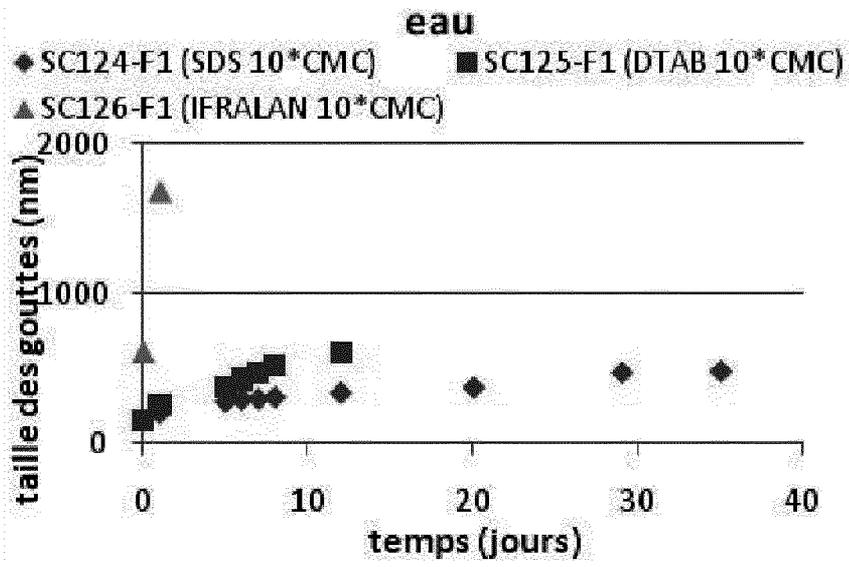


FIG.6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/068984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K49/18 A61K9/107
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, EMBASE, BIOSIS, INSPEC

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | FANG ET AL: "A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, vol. 67, no. 1, 30 June 2007 (2007-06-30), pages 67-75, XP022136340, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL ISSN: 0939-6411, DOI: 10.1016/J.EJPB.2007.01.008 abstract page 67, left-hand column, paragraph 1 page 68, sections 2.1 et 2.2 table 1 page 73, right-hand column, paragraph 4 ----- -/-- | 1-12,14, 15 |

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 | "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 |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "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 |
| "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) | "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 |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search 19 October 2012 | Date of mailing of the international search report 29/10/2012 |
| 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 Villard, Anne-Laure |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/068984

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| L | <p>Anonymous: "Fatty acids composition of virgin coconut oil", The Virgin Coconut Oil , XP002671755, Retrieved from the Internet: URL:http://www.thevirgincoconutoil.com/articleitem.php?articleid=163 [retrieved on 2012-03-16] the whole document</p> | 1-15 |
| X | <p>-----</p> <p>WO 2007/100715 A2 (UNIV WASHINGTON [US]; WICKLINE SAMUEL A [US]; LANZA GREGORY M [US]) 7 September 2007 (2007-09-07) paragraphs [0023], [0029], [0044], [0056], [0070] figure 7</p> | 1-7, 11-15 |
| A | <p>-----</p> <p>BOZAN B ET AL: "Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 99, no. 14, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 6354-6359, XP022679206, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2007.12.009 [retrieved on 2008-01-15] table 3 page 6357, left-hand column, line 2</p> | 1-15 |
| X | <p>-----</p> <p>WO 93/11868 A1 (HEMAGEN PFC [US]) 24 June 1993 (1993-06-24) page 1, lines 15-20 page 3, lines 22-25 page 5, lines 29-31 page 8, line 21 examples</p> | 1-7, 11-15 |
| X | <p>-----</p> <p>WO 2006/100305 A2 (GUERBET SA [FR]; PORT MARC [FR]) 28 September 2006 (2006-09-28) page 13, line 6 - page 14, line 23 page 16; compounds examples 5,8,19,21</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/068984

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>WO 97/21425 A1 (ALLIANCE PHARMA [US]) 19 June 1997 (1997-06-19) page 3, line 2 page 6, lines 8-17 page 7, lines 19-25 page 7, line 29 - page 8, line 7 page 12, line 1 - page 13, line 24 page 14, line 2 - page 15, line 25 page 15, line 29 - page 16, line 4 page 22, lines 3-14 page 24, lines 15-16 examples 6,8,24-26,31-34</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1-7, 11-15 |
| X | <p>WO 2009/154425 A2 (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]; CHUNG BONG HYUN [KR]; LIM YONG TAIK) 23 December 2009 (2009-12-23) paragraphs [0016], [0027] - [0030], [0042] - [0044], [0057] - [0060] page 10; examples 1-4 figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1-7, 11-15 |
| X | <p>WO 2007/112100 A2 (UNIV UTAH RES FOUND [US]; YU YIHUA [US]; JIANG ZHONG-XING [US]) 4 October 2007 (2007-10-04) paragraphs [0022], [0088], [0090], [0150], [0169], [0189]</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1,2,6,7, 11-15 |
| X | <p>WO 03/062198 A1 (BARNES JEWISH HOSPITAL [US]; BRISTOL MYERS SQUIBB MEDICAL I [US]) 31 July 2003 (2003-07-31) cited in the application paragraphs [0031], [0032], [0035], [0094] page 35, composé "Part B"</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1-7, 11-15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/068984

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|--|
| WO 2007100715 | A2 | 07-09-2007 | US 2009263329 A1 WO 2007100715 A2 |
| ----- | | | |
| WO 9311868 | A1 | 24-06-1993 | AT 196857 T AU 3248493 A CA 2125401 A1 DE 69231503 D1 DE 69231503 T2 EP 0625068 A1 JP 3504264 B2 JP H07509397 A US 5403575 A US 5785950 A WO 9311868 A1 |
| ----- | | | |
| WO 2006100305 | A2 | 28-09-2006 | AT 437878 T EP 1885721 A2 ES 2330140 T3 FR 2883562 A1 US 2009214441 A1 WO 2006100305 A2 |
| ----- | | | |
| WO 9721425 | A1 | 19-06-1997 | AU 1289197 A US 5733526 A WO 9721425 A1 |
| ----- | | | |
| WO 2009154425 | A2 | 23-12-2009 | KR 20090132430 A US 2011110867 A1 WO 2009154425 A2 |
| ----- | | | |
| WO 2007112100 | A2 | 04-10-2007 | US 2009264397 A1 WO 2007112100 A2 |
| ----- | | | |
| WO 03062198 | A1 | 31-07-2003 | AU 2003209392 B2 AU 2009200095 A1 BR 0307206 A CA 2474386 A1 CN 1738815 A CN 101249269 A CO 5601001 A2 EP 1572639 A1 EP 2269659 A1 JP 4731117 B2 JP 2005525319 A JP 2010248248 A MX PA04007188 A NZ 534500 A TR 200401834 T2 US 2004058951 A1 US 2006147380 A1 US 2008175792 A1 WO 03062198 A1 ZA 200406686 A |
| ----- | | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2012/068984

| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K49/18 A61K9/107 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, EMBASE, BIOSIS, INSPEC | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | FANG ET AL: "A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, vol. 67, no. 1, 30 juin 2007 (2007-06-30), pages 67-75, XP022136340, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL ISSN: 0939-6411, DOI: 10.1016/J.EJPB.2007.01.008 abrégé page 67, colonne de gauche, alinéa 1 page 68, sections 2.1 et 2.2 tableau 1 page 73, colonne de droite, alinéa 4 ----- -/-- | 1-12,14, 15 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents | <input checked="" type="checkbox"/> 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 | |
| 19 octobre 2012 | 29/10/2012 | |
| 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 | Villard, Anne-Laure | |

| C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| L | <p>Anonymous: "Fatty acids composition of virgin coconut oil", The Virgin Coconut Oil , XP002671755, Extrait de l'Internet: URL:http://www.thevirgincoconutoil.com/articleitem.php?articleid=163 [extrait le 2012-03-16] le document en entier</p> | 1-15 |
| X | <p>-----</p> <p>WO 2007/100715 A2 (UNIV WASHINGTON [US]; WICKLINE SAMUEL A [US]; LANZA GREGORY M [US]) 7 septembre 2007 (2007-09-07) alinéas [0023], [0029], [0044], [0056], [0070] figure 7</p> | 1-7, 11-15 |
| A | <p>-----</p> <p>BOZAN B ET AL: "Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 99, no. 14, 1 septembre 2008 (2008-09-01), pages 6354-6359, XP022679206, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2007.12.009 [extrait le 2008-01-15] tableau 3 page 6357, colonne de gauche, ligne 2</p> | 1-15 |
| X | <p>-----</p> <p>WO 93/11868 A1 (HEMAGEN PFC [US]) 24 juin 1993 (1993-06-24) page 1, ligne 15-20 page 3, ligne 22-25 page 5, ligne 29-31 page 8, ligne 21 exemples</p> | 1-7, 11-15 |
| X | <p>-----</p> <p>WO 2006/100305 A2 (GUERBET SA [FR]; PORT MARC [FR]) 28 septembre 2006 (2006-09-28) page 13, ligne 6 - page 14, ligne 23 page 16; composés exemples 5,8,19,21</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-15 |

| C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|--|
| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | <p>WO 97/21425 A1 (ALLIANCE PHARMA [US]) 19 juin 1997 (1997-06-19) page 3, ligne 2 page 6, ligne 8-17 page 7, ligne 19-25 page 7, ligne 29 - page 8, ligne 7 page 12, ligne 1 - page 13, ligne 24 page 14, ligne 2 - page 15, ligne 25 page 15, ligne 29 - page 16, ligne 4 page 22, ligne 3-14 page 24, ligne 15-16 exemples 6,8,24-26,31-34</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | <p>1-7, 11-15</p> |
| X | <p>WO 2009/154425 A2 (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]; CHUNG BONG HYUN [KR]; LIM YONG TAIK) 23 décembre 2009 (2009-12-23) alinéas [0016], [0027] - [0030], [0042] - [0044], [0057] - [0060] page 10; exemples 1-4 figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | <p>1-7, 11-15</p> |
| X | <p>WO 2007/112100 A2 (UNIV UTAH RES FOUND [US]; YU YIHUA [US]; JIANG ZHONG-XING [US]) 4 octobre 2007 (2007-10-04) alinéas [0022], [0088], [0090], [0150], [0169], [0189]</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | <p>1,2,6,7, 11-15</p> |
| X | <p>WO 03/062198 A1 (BARNES JEWISH HOSPITAL [US]; BRISTOL MYERS SQUIBB MEDICAL I [US]) 31 juillet 2003 (2003-07-31) cité dans la demande alinéas [0031], [0032], [0035], [0094] page 35, composé "Part B"</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | <p>1-7, 11-15</p> |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2012/068984

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|----|------------------------|--|--|
| WO 2007100715 | A2 | 07-09-2007 | US 2009263329 A1 WO 2007100715 A2 | 22-10-2009 07-09-2007 |
| ----- | | | | |
| WO 9311868 | A1 | 24-06-1993 | AT 196857 T AU 3248493 A CA 2125401 A1 DE 69231503 D1 DE 69231503 T2 EP 0625068 A1 JP 3504264 B2 JP H07509397 A US 5403575 A US 5785950 A WO 9311868 A1 | 15-10-2000 19-07-1993 24-06-1993 16-11-2000 07-06-2001 23-11-1994 08-03-2004 19-10-1995 04-04-1995 28-07-1998 24-06-1993 |
| ----- | | | | |
| WO 2006100305 | A2 | 28-09-2006 | AT 437878 T EP 1885721 A2 ES 2330140 T3 FR 2883562 A1 US 2009214441 A1 WO 2006100305 A2 | 15-08-2009 13-02-2008 04-12-2009 29-09-2006 27-08-2009 28-09-2006 |
| ----- | | | | |
| WO 9721425 | A1 | 19-06-1997 | AU 1289197 A US 5733526 A WO 9721425 A1 | 03-07-1997 31-03-1998 19-06-1997 |
| ----- | | | | |
| WO 2009154425 | A2 | 23-12-2009 | KR 20090132430 A US 2011110867 A1 WO 2009154425 A2 | 30-12-2009 12-05-2011 23-12-2009 |
| ----- | | | | |
| WO 2007112100 | A2 | 04-10-2007 | US 2009264397 A1 WO 2007112100 A2 | 22-10-2009 04-10-2007 |
| ----- | | | | |
| WO 03062198 | A1 | 31-07-2003 | AU 2003209392 B2 AU 2009200095 A1 BR 0307206 A CA 2474386 A1 CN 1738815 A CN 101249269 A CO 5601001 A2 EP 1572639 A1 EP 2269659 A1 JP 4731117 B2 JP 2005525319 A JP 2010248248 A MX PA04007188 A NZ 534500 A TR 200401834 T2 US 2004058951 A1 US 2006147380 A1 US 2008175792 A1 WO 03062198 A1 ZA 200406686 A | 09-10-2008 05-02-2009 21-12-2004 31-07-2003 22-02-2006 27-08-2008 31-01-2006 14-09-2005 05-01-2011 20-07-2011 25-08-2005 04-11-2010 18-10-2005 27-07-2007 21-10-2005 25-03-2004 06-07-2006 24-07-2008 31-07-2003 19-09-2005 |
| ----- | | | | |