

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
20 novembre 2003 (20.11.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 03/095085 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : B01J 13/00,  
C01B 25/32

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR03/01434

(22) Date de dépôt international : 12 mai 2003 (12.05.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/05905 14 mai 2002 (14.05.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : RHO-  
DIA CHIMIE [FR/FR]; 26, quai Alphonse Le Gallo,  
F-92512 Boulogne-Billancourt Cedex (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : CHANE-  
CHING, Jean-Yves [FR/FR]; 15, rue Suzanne, F-95600  
Baubonne (FR).

(74) Mandataire : DUBRUC, Philippe; Rhodia Services, Di-  
rection de la Propriété Industrielle, 40, rue de la Haie-Coq,  
F-93306 Aubervilliers Cedex (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: COLLOIDAL DISPERSION OF CALCIUM PHOSPHATE NANOPARTICLES AND AT LEAST ONE PROTEIN,  
AND CORRESPONDING REDISPERSIBLE AND CALCINED NANOPARTICLES, PREPARATION METHOD AND USES

(54) Titre : DISPERSION COLLOÏDALE DE NANOPARTICULES DE PHOSPHATE DE CALCIUM ET D'AU MOINS UNE  
PROTEINE, AINSI QUE LES NANOPARTICULES REDISPERSABLES ET LES PARTICULES CALCINÉES CORRESPON-  
DANTES, PROCÉDE DE PREPARATION ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns colloidal dispersions of calcium phosphate nanoparticles and at least one protein, the size of  
said nanoparticles ranging between 50 and 300 nm, and the morphology of said nanoparticles being spherical. Said dispersions are  
prepared by a method characterized in that it comprises the following steps: forming a mixture comprising the calcium complexing  
agent and a calcium source, then adding to said medium at least one protein, thereafter adding thereto a phosphorus source and  
heating the medium. The invention also concerns nanoparticles obtained by freeze-drying said dispersion, and the particles obtained  
by calcining the freeze-dried nanoparticles. The invention can be used in the food, cosmetic, pharmacological industries.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des dispersions colloïdales de nanoparticules de phosphate de calcium et d'au moins  
une protéine, et dont la taille desdites nanoparticules est comprise entre 50 à 300 nm, et dont la morphologie desdites nanoparticules  
est sphérique. Ces dispersions sont préparées par un procédé caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes: on forme un  
mélange comprenant l'agent complexant du calcium et une source de calcium, puis on ajoute à ce milieu au moins une protéine,  
ensuite on y ajoute une source de phosphore, puis on chauffe le milieu. L'invention concerne également des nanoparticules obtenues  
par lyophilisation de la dispersion précédente, ainsi que les particules obtenues par calcination des nanoparticules lyophilisées. Enfin  
l'invention peut être utilisée dans les industries alimentaires, cosmétiques, pharmacologiques.

WO 03/095085 A1

**Dispersion colloïdale de nanoparticules de phosphate de calcium et d'au moins une protéine, ainsi que les nanoparticules redispersables et les particules calcinées correspondantes, procédé de préparation et utilisations.**

5        La présente invention a pour objet des dispersions colloïdales de nanoparticules de phosphate de calcium, et d'au moins une protéine. Elle concerne également les nanoparticules obtenues par lyophilisation de la dispersion précédente, ainsi que les particules obtenues par calcination des nanoparticules lyophilisées.

10       Enfin l'invention a aussi pour objet le procédé de préparation et les utilisations de ces dispersions et de ces nanoparticules.

      Dans de nombreux produits, il est utile d'ajouter une source de composé de calcium pour enrichir ce produit en calcium en fonction des besoins des consommateurs. C'est le cas notamment dans le domaine alimentaire où l'on cherche à supplémenter en calcium les aliments, les boissons ou les préparations alimentaires.

15       C'est également le cas dans le domaine pharmacologique où il est utile d'ajouter une source de composé de calcium dans des comprimés ou des solutions dans le but, par exemple, de prévenir l'ostéoporose ou pour traiter les maladies des os.

      Les techniques connues pour supplémenter un produit en calcium consistent à y ajouter des sels de calcium solubles, par exemple du gluconate de calcium.

20       Il est également connu d'utiliser du phosphate de calcium comme source de calcium, notamment sous forme de dispersion.

      Cependant dans le cas de l'utilisation de phosphate de calcium, les dispersions obtenues ne sont pas stables.

      De plus il est difficile d'obtenir des poudres de phosphate de calcium précurseurs d'hydroxy-apatites à morphologie isotrope. En effet l'hydroxy-apatite développe classiquement une morphologie anisotrope.

25       C'est également le cas dans le domaine pharmacologique où il est utile d'ajouter une source de composé de calcium dans des comprimés ou des solutions dans le but, par exemple, de prévenir l'ostéoporose ou pour traiter les maladies des os.

      Cependant les techniques actuelles ne permettent pas d'obtenir des composés qui soient stables et dont la morphologie est contrôlée.

      Afin de répondre aux exigences des industriels, il est devenu nécessaire de trouver d'autres moyens pour apporter des composés stables dont la morphologie est contrôlée et de petite taille.

30       C'est également le cas dans le domaine pharmacologique où il est utile d'ajouter une source de composé de calcium dans des comprimés ou des solutions dans le but, par exemple, de prévenir l'ostéoporose ou pour traiter les maladies des os.

      Aussi le problème que se propose de résoudre l'invention est de fournir un composé, notamment sous forme de dispersion, stable, de taille nanométrique, et à morphologie contrôlée.

35       Dans ce but l'invention propose selon un premier mode de réalisation des dispersions colloïdales de nanoparticules de phosphate de calcium et d'au moins une protéine, et dont la taille desdites nanoparticules est comprise entre 50 à 300 nm, et dont la morphologie desdites nanoparticules est sphérique.

L'invention propose également selon un second mode de réalisation, des nanoparticules caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par lyophilisation des dispersions colloïdales décrites ci-dessus.

5 L'invention propose selon un troisième mode de réalisation des particules caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par calcination des nanoparticules décrites ci-dessus.

L'invention a également pour objet le procédé de préparation des dispersions colloïdales de nanoparticules de phosphate de calcium et d'au moins une protéine caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10 (a) on forme un mélange comprenant l'agent complexant du calcium et une source de calcium,  
(b) on ajoute au milieu issu de l'étape (a), au moins une protéine,  
(c) on ajoute au milieu issu de l'étape (b), une source de phosphore,  
(d) on chauffe le milieu issu de l'étape (c)

15 L'invention a également pour autre objet l'utilisation des dispersions colloïdales de nanoparticules de phosphate de calcium et d'au moins une protéine dans les industries alimentaires, cosmétiques, pharmacologiques.

L'invention a également pour autre objet l'utilisation des nanoparticules ou des nanoparticules calcinées dans les industries alimentaires, cosmétiques,  
20 pharmacologiques.

L'invention a pour avantage d'apporter une source de calcium qui peut être un précurseur d'hydroxy-apatite [  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  ] qui est la substance minérale qui se dépose sur la matrice osseuse au cours de l'édification du squelette.

L'invention a pour autre avantage de fournir des dispersions colloïdales et / ou des  
25 nanoparticules de phosphate de calcium, qui sont utilisables dans le domaine dentaire afin d'éviter la déminéralisation, notamment dans les pâtes dentifrices ou les bains de bouche.

L'invention a encore comme avantage de ne pas utiliser de caséines.

Un autre avantage de l'invention est de fournir des dispersions colloïdales et / ou  
30 des nanoparticules qui puissent fournir de fortes concentrations en calcium aux produits auxquelles elles sont ajoutées.

L'invention a encore pour avantage de proposer des particules calcinées, comme par exemple une hydroxy-apatite, à morphologie isotrope sphérique qui peut par exemple présenter un vif intérêt en chromatographie.

35 D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront clairement à la lecture de la description et des exemples donnés à titre purement illustratif et non limitatif, qui vont suivre.

L'invention concerne tout d'abord une dispersion colloïdale de nanoparticules de phosphate de calcium et d'au moins une protéine, et dont la taille desdites nanoparticules est comprise entre 50 à 300 nm, et dont la morphologie desdites nanoparticules est sphérique.

5 La dispersion colloïdale de nanoparticules selon l'invention comprend au moins une protéine. Avantageusement il s'agit d'au moins une protéine soluble, de préférence dans une phase aqueuse, notamment l'eau.

Par au moins une protéine, on entend également selon l'invention au moins un polypeptide.

10 Les protéines selon l'invention peuvent être sous forme dénaturée.

De préférence, on utilisera des protéines d'origine naturelle, des protéines d'origine naturelle modifiées pour améliorer leur solubilité dans une phase aqueuse, des polypeptides naturelles et / ou modifiées, à l'exclusion des caséines. Ces protéines peuvent contenir des groupements à base de phosphore ou non.

15 A titre de protéines on peut citer notamment au moins une protéine choisie dans le groupe constitué par les lysozymes, les protéines de soja, les protéines issues de la phase soluble du lait, les protéines issues des différents types de lactosérums.

A titre d'exemple de protéines d'origine végétales, on peut citer les protéines provenant de pois, de féverole, de lupin, de haricot, de lentille, du blé, de l'orge, du  
20 seigle, du maïs, du riz, de l'avoine, et du millet, du soja, de l'arachide, du tournesol; du colza, du sénévé (notamment moutarde), de la noix de coco (coprah), de luzerne, d'orties, de pomme de terre, et de betterave.

A titre de protéines d'origines animales, on peut citer de façon non limitative les protéines laitières comme par exemple, les protéines de l'œuf comme les ovalbumines,  
25 les protéines issues des os et / ou de la peau des bœufs, porcs ou poisson, comme la gélatine.

Comme protéines d'origine naturelle modifiée, on peut citer les protéines de soja, comme celles commercialisées par la société Protein Technologies International ou Dupont de Nemours.

30 Les dispersions colloïdales de nanoparticules selon l'invention ne contiennent pas de caséines. Cela signifie qu'il n'y a pas de caséines ajoutées, ou ni de sels de caséines ajoutés, au cours de la préparation de ces dispersions colloïdales de nanoparticules selon l'invention. Par contre il peut y avoir des traces de caséines ou de leurs sels présentés dans les dispersions colloïdales de nanoparticules, dues à l'utilisation d'au  
35 moins une protéine issue de la phase soluble du lait, ou des différents types de lactosérums, ou de toutes autres fractions.

Les dispersions colloïdales de nanoparticules selon l'invention peuvent également contenir au moins un agent complexant du calcium.

Cet agent complexant du calcium peut posséder avantageusement au moins une fonction carboxylate, de préférence au moins trois fonctions carboxylates, et encore plus préférentiellement au moins quatre fonctions carboxylates.

5 L'agent complexant possède avantageusement diverses fonctions acides caractérisées par des valeurs de  $pK_a$ , co-logarithme des constantes d'acidités comprises entre 1,5 et 8, et des constantes de dissociation de complexes avec l'ion calcium, caractérisées par des valeurs de  $pK_c$ , co-logarithme des constantes de complexation comprise entre 2 et 8, de préférence comprise entre 2 et 6.

10 L'agent complexant du calcium préféré selon l'invention est le sel de sodium de l'acide glutamique N,N diacétique de formule  $(NaCOO)CH_2CH_2-CH(COONa)N(CH_2COONa)_2$ .

L'agent complexant du calcium peut dans certains cas se trouver à l'intérieur et / ou en surface des nanoparticules constitutives de la dispersion colloïdale, mais également dans la phase continue de la dispersion, ou dans les deux à la fois.

15 Les nanoparticules de la dispersion colloïdale selon l'invention sont généralement formées de cristallites élémentaires de diamètre compris entre 3 et 20 nm.

Par cristallites élémentaires, on entend des cristallites constitutifs des nanoparticules. Ces cristallites élémentaires sont avantageusement de morphologie isotrope de taille comprise entre 3 et 20 nm, visibles par microscopie électronique à  
20 transmission.

La structure du phosphate de calcium contenu dans les nanoparticules de la dispersion colloïdale selon l'invention est généralement amorphe par diffraction aux rayons X. Cette caractérisation par diffraction aux rayons X est effectuée sur les poudres obtenues par lyophilisation des dispersions colloïdales selon l'invention. Par  
25 spectroscopie RMN solide du  $P^{31}$ , ces phosphates de calcium sont caractérisés par une raie majoritaire à un déplacement chimique compris entre 2,5 et 4 ppm, de préférence vers 3,4 ppm et une raie complémentaire dont le déplacement chimique est compris entre 5 et 7 ppm, de préférence vers 6,4 ppm. La raie vers 3,4 ppm est généralement attribuée à une hydroxy-apatite carbonatée.

30 Selon un mode de réalisation préférentiel, les nanoparticules de la dispersion colloïdale selon l'invention ont majoritairement une morphologie sphérique. Elles ont avantageusement une taille nanométrique, avec un diamètre compris entre 50 et 300 nm.

Par morphologie sphérique, on entend une morphologie caractérisée par un indice  
35 de forme défini par le rapport  $R = \text{grand diamètre} / \text{petit diamètre}$ .

Dans le cas de l'invention ce rapport R, tend avantageusement vers 1 à 1,5, de préférence de 1 à 1,25 et encore plus préférentiellement de 1 à 1,1.

Avantageusement ces nanoparticules de la dispersion colloïdale selon l'invention sont individualisées avec un pourcentage de nanoparticules individualisées en nombre supérieur ou égal à 60%, de préférence supérieur ou égal à 80 %, et encore plus préférentiellement supérieur ou égal à 90%.

5 La répartition en taille est généralement monodisperse.

Par monodisperse on entend des nanoparticules qui sont homogènes en taille et caractérisées par un rapport  $r = (d_{90} - d_{10}) / 2 d_{50}$  compris entre 0,05 et 0,5, de préférence entre 0,05 et 0,25 et avantageusement entre 0,05 et 0,125.

10 On peut utiliser la technique de cryo MET pour déterminer la taille, la monodispersité et l'état d'agrégation des particules élémentaires. Elle permet d'observer par microscopie électronique à transmission (MET), des échantillons maintenus congelés dans leur milieu naturel qui est de l'eau. La congélation s'effectue sur des films minces d'environ 50 à 100 nm d'épaisseur dans l'éthane liquide. Par cryo MET, l'état de dispersion des particules est bien préservé et représentatif de celui présent dans le milieu réel.

15 Les nanoparticules de la dispersion colloïdale selon l'invention présentent un rapport phosphate de calcium / protéines, exprimé en masse de phosphate de calcium / masse de protéines compris entre 0,5 / 1 et 6 / 1.

20 Les nanoparticules de la dispersion colloïdale selon l'invention présentent parfois une composition en phosphate de calcium et en protéines qui est homogène. C'est à dire que les nanoparticules sont par exemple constituées par un assemblage de cristallites élémentaires de phosphates de calcium et de protéines réalisées de manière homogène ou par un assemblage hétérogène de type cœur-écorce, avec une plus forte concentration de cristallites de phosphates de calcium en périphérie des nanoparticules.

25 Le degré d'homogénéité de l'assemblage peut être mis en évidence par cryo microscopie à transmission (méthode Dubochet). Un contraste plus fort est observé pour le phosphate de calcium en comparaison des parties de protéines.

30 Les dispersions colloïdales de nanoparticules selon l'invention présentent avantageusement un pH compris entre 4 à 8, de préférence un pH compris entre 5 à 7,5.

La charge de surface des nanoparticules de la dispersion colloïdale peut être positive ou négative selon la nature des protéines. Ainsi, à pH voisin de pH 6, les nanoparticules de la dispersion colloïdale développent une charge de surface identique à la charge développée par la protéine au même pH. Les nanoparticules de la dispersion colloïdale développent ainsi des charges négatives lorsque les protéines sont des protéines de type protéines de la phase soluble du lait ou de type protéines de soja.

35 Elles développent des charges positives lorsque la protéine utilisée est une protéine de

type lysozyme. Ces charges de surface peuvent être déterminées par exemple par le tracé des courbes de potentiels électrophorétiques en fonction du pH.

Les dispersions colloïdales de nanoparticules selon l'invention possèdent avantageusement une concentration en phosphate de calcium exprimé en concentration équivalente en calcium comprise entre 0,2 à 2 M en calcium.

Les dispersions colloïdales selon l'invention peuvent être concentrées par post-concentration ou par ultrafiltration. Les dispersions colloïdales possèdent alors des concentrations exprimées en calcium supérieures à 1M en calcium.

Les dispersions colloïdales selon l'invention peuvent contenir des sels résiduels formés à partir des anions et cations associés contenus dans les solutions précurseurs de calcium et de phosphate de type, par exemple, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KCl, KNO<sub>3</sub>. Elles peuvent également contenir des complexants, des protéines, des ions calciums et / ou des ions phosphates résiduels sous forme libre.

Des composés initialement présents dans les solutions de protéines peuvent également être présents au sein de dispersions colloïdales comme par exemple le lactose.

Ces concentrations résiduelles en composés précédemment définies peuvent être minimisées par purification des dispersions colloïdales par ultrafiltration.

L'invention concerne selon un second objet les nanoparticules obtenues par lyophilisation des dispersions colloïdales précédemment décrites. Elles sont parfois dénommées nanoparticules lyophilisées, dans la suite du texte.

Ces nanoparticules selon l'invention sont réalisées selon les techniques classiques de lyophilisation, de préférence après lavage par ultrafiltration de la dispersion colloïdale à lyophiliser.

Ces nanoparticules selon l'invention sont redispersibles dans l'eau pour donner des dispersions colloïdales.

En effet, à partir des nanoparticules selon l'invention, il est possible de réaliser des dispersions colloïdales ayant avantageusement les caractéristiques des dispersions précédemment décrites.

La stabilité colloïdale des dispersions obtenues par simple redispersion dans l'eau de ces nanoparticules lyophilisées, est avantageusement supérieure à un jour, de préférence supérieure à une semaine, de préférence parfaitement stable au cours du temps à la condition de conserver la dispersion à l'abri des bactéries.

Ces nanoparticules comprennent au moins une protéine ayant les mêmes caractéristiques que celles définies précédemment, dans le cas des dispersions.

La structure du phosphate de calcium contenu dans les nanoparticules selon le second objet de l'invention est identique à celle décrite pour le premier objet de l'invention.

Les nanoparticules lyophilisées peuvent également contenir des sels du type  
5 NaCl, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, KNO<sub>3</sub>, KCl.

Les nanoparticules lyophilisées peuvent également contenir de l'eau. La quantité d'eau est alors comprise entre 0,1 et 10 %, de préférence comprise entre 1 et 8 %, pourcentage exprimé en poids.

Selon un mode de réalisation préférentiel, les nanoparticules selon l'invention ont  
10 majoritairement une morphologie sphérique, une taille nanométrique, une répartition monodisperse, et présentent parfois une composition en phosphate de calcium et en protéines qui est homogène, comme déjà décrit plus haut en ce qui concerne les nanoparticules de la dispersion.

Le rapport phosphate de calcium / protéines est le même que celui décrit pour les  
15 nanoparticules de la dispersion.

Enfin l'invention concerne également les dispersions colloïdales caractérisée en ce qu'elles sont obtenues par remise en suspension des nanoparticules lyophilisées.

L'invention concerne selon un troisième objet des particules qui sont obtenues par  
20 calcination des nanoparticules décrites ci-dessus et qui elles-mêmes ont été obtenues par lyophilisation des dispersions colloïdales précédemment décrites.

La calcination est effectuée de préférence soit sous air, ou soit sous atmosphère inerte, puis air et de préférence avec un gradient de température supérieur ou égal à 400°C / min.

De préférence, il convient de réaliser une calcination dite « flash », c'est à dire  
25 avec introduction dans un four préalablement chauffé à la température de calcination et maintenu à cette température de calcination pendant un temps variant de 2 min à 1 heure.

La calcination peut avoir lieu à des températures comprises avantageusement  
30 entre 200°C et 1000°C, et de préférence comprise entre 300°C et 800°C.

De préférence, concernant l'obtention de poudres calcinées à morphologie isotrope, on utilise des poudres redispersables caractérisées par un rapport massique "Phosphate de calcium : protéines" élevé, c'est à dire un rapport massique variant de 2:1 à 6:1.

Il est préférable de calciner des nanoparticules lyophilisées ayant un rapport  
35 phosphate de calcium / protéines, supérieur ou égale à 3.

Les particules calcinées selon l'invention ont avantageusement une morphologie isotrope, éventuellement agglomérées et sont de préférence de taille nanométrique.



Ces particules calcinées présentent après calcination une structure de type apatitique, encore appelée hydroxy-apatite, de préférence de formule du type  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ou  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , ou  $\text{CaHPO}_4$ , ou  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , ou encore phosphate de calcium amorphe, seul ou en mélange.

5 Les particules calcinées selon l'invention peuvent contenir éventuellement la présence de sels du type  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Les particules calcinées selon l'invention peuvent éventuellement et dans des cas très rares, contenir la présence de traces de protéines ou de polypeptides ou d'agent complexant ou leurs résidus, provenant de la pyrolyse des protéines ou des polypeptides ou de l'agent complexant.

10 Les particules calcinées selon l'invention sont généralement anhydres.

Les particules calcinées selon l'invention présentent avantageusement une isotropie, avec un rapport R, (avec  $R = \text{grand diamètre (L)} / \text{petit diamètre (l)}$ ) tendant avantageusement vers 1 à 1,5, de préférence de 1 à 1,3.

15

L'invention concerne selon un quatrième objet un procédé de préparation des dispersions colloïdales selon l'invention qui comprend les étapes suivantes :

(a) on forme un mélange comprenant l'agent complexant du calcium et une source de calcium,

20 (b) on ajoute au milieu issu de l'étape (a), au moins une protéine,

(c) on ajoute au milieu issu de l'étape (b), une source de phosphore,

(d) on chauffe le milieu issu de l'étape (c)

La source de calcium utilisée à l'étape (a) est avantageusement un sel de calcium, ou un hydroxyde de calcium ou un carbonate de calcium. On peut citer notamment le dichlorure de calcium, le nitrate de calcium, de la chaux hydratée, du carbonate de calcium.

25 La concentration en calcium est avantageusement d'au plus 1 M, de préférence au plus 0,5 M dans le mélange formé à l'étape (a).

L'étape (a) du procédé de préparation selon l'invention est caractérisé en ce que le pH du milieu issu de l'étape (a) est avantageusement ajusté de manière à obtenir un pH compris entre 5 et 7. L'ajustement de pH est classiquement réalisé par l'addition d' $\text{HCl}$  ou  $\text{HNO}_3$ .

L'étape (a) du procédé est réalisée avec un rapport molaire  $R_a$ , pour lequel  $R_a = \text{agent complexant du calcium} / \text{calcium}$ , avantageusement compris entre 0,1 et 3.

35 A l'étape b), la solution de protéines utilisée est généralement obtenue par simple dispersion de la protéine dans de l'eau déminéralisée.

La source de phosphore utilisée à l'étape (c) est avantageusement un sel de phosphate de métal alcalin ou d'ammonium. On peut citer notamment le

dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ou le monohydrogénophosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), ou le dihydrogénophosphate d'ammonium ( $\text{NH}_4(\text{H}_2\text{PO}_4)$ ), ou le monohydrogénophosphate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_2(\text{HPO}_4)$ ).

5 Au cours du procédé de préparation selon l'invention et avant l'addition de la source de phosphore selon l'étape (c), on ajuste avantageusement le pH du milieu à une valeur comprise entre 4,5 et 8.

L'étape (c) du procédé est réalisée avec un rapport massique  $R_b$ , pour lequel  $R_b$  = phosphate de calcium / protéine(s), compris avantageusement entre 0,3 et 6.

10 L'étape (c) du procédé est réalisée avec un rapport molaire  $R_c$ , pour lequel  $R_c$  = moles de calcium / mole de phosphore, compris avantageusement entre 1 et 4.

Les diverses additions de réactifs sont réalisées à vitesse contrôlée ou de préférence de manière instantanée et à température ambiante.

15 Au cours de l'étape (d) du procédé, on chauffe le milieu issu de l'étape (c) à une température avantageusement comprise entre 20°C et 90°C. Cette étape est réalisée selon les méthodes classiques de traitement thermique.

De préférence, on introduit le milieu issu de l'étape (c) dans une étuve préalablement chauffée à la température du traitement thermique. La durée du traitement thermique est généralement comprise entre 2 heures et 24 heures de préférence entre 6 heures et 20 heures.

20 La dispersion colloïdale peut alors être purifiée par lavage par de l'eau déminéralisée par ultrafiltration. Le lavage par ultrafiltration permet d'éliminer les sels et les complexants libres résiduels. Les dispersions colloïdales peuvent également être concentrées par ultrafiltration.

25 Il est également possible d'ajouter un agent anti bactérien à la dispersion colloïdale obtenue.

30 L'invention concerne selon un cinquième objet l'utilisation des dispersions colloïdales selon l'invention ou des dispersions colloïdales obtenues par le procédé de préparation selon l'invention dans les industries alimentaires, cosmétiques, pharmacologiques.

L'invention concerne également l'utilisation des nanoparticules lyophilisées selon l'invention et des nanoparticules calcinées selon l'invention dans les industries alimentaires, cosmétiques, pharmacologiques.

35 Elle concerne également l'utilisation des dispersions colloïdales ou des nanoparticules lyophilisées ou des particules calcinées pour le conditionnement et / ou le stockage de protéines, de polypeptides ou de toutes autres molécules.

Elle concerne aussi l'utilisation des nanoparticules calcinées comme support pour la chromatographie.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

## 5           **EXEMPLES**

### **1 / Préparation de dispersions colloïdales**

#### **1-1/ Exemple 1-1 : Dispersion colloïdale de phosphate de calcium, d'agent 10   complexant et de protéines de soja**

Etape (a) : Une solution A contenant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  est obtenue en dissolvant 2,75 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (PM = 147,02 g, soit 18,7 millimoles de Ca) dans de l'eau déminéralisée et addition de 26,5 cm<sup>3</sup> de complexant GBS 5 de formule développée  $\text{NaCOO}(\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{-CH}(\text{COONa}) \text{N}(\text{CH}_2\text{COONa})_2$  à 1,4 M, soit 37,4 millimoles de GBS 5. Le mélange  
15   possède un pH de 13. On ajuste à pH 6 par HCl 1M. Le volume final est de 35 cm<sup>3</sup>.

Etape (b) : Une solution B contenant des protéines de soja ( commercialisée par Protein Technologies International, DuPont) Qualité FP 940 est obtenue en additionnant 1,87 g de protéines à de l'eau déminéralisée. On complète à 25 cm<sup>3</sup> par de l'eau  
20   déminéralisée. On verse de manière instantanée la solution B dans la solution A fraîchement préparée.

Etape (c) : Une solution C contenant des ions phosphate de sodium est obtenue par addition de 0,88 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( PM = 141,96 g, soit 6,23 millimoles de P) dans 25 cm<sup>3</sup>. On ajuste à pH 6 par HCl 1M. On additionne au mélange précédent, la solution C de  
25   manière instantanée. On réajuste l'ensemble réactionnel à pH 6. L'ensemble est laissé sous agitation 5 min.

Etape (d) : On porte l'ensemble réactionnel dans une étuve préalablement chauffée à 50°C.  
30   La dispersion présente un aspect colloïdal après 16 heures à 50°C.

#### **1-2/ Exemple 1-2 : Dispersion colloïdale de phosphate de calcium, d'agent complexant et de protéines de lysozyme**

35   Etape (a) : Une solution A contenant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  est obtenue en dissolvant 2,75 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (PM = 147,02 g, soit 18,7 millimoles de Ca) dans de l'eau déminéralisée et addition de 26,5 cm<sup>3</sup> de complexant GBS 5 de formule développée  $\text{NaCOO}(\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{-}$

CH-(COONa) N (CH<sub>2</sub>COONa)<sub>2</sub> à 1,4 M, soit 37,4 millimoles de GBS 5. Le mélange possède un pH de 13. On ajuste à pH 6 par HCl 1M. Le volume final est de 35 cm<sup>3</sup>.

Etape (b) : Une solution B contenant du lysozyme est obtenue en additionnant 1,87 g de lysozyme à de l'eau déminéralisée. On complète à 25 cm<sup>3</sup> par de l'eau déminéralisée.

5 On verse de manière instantanée la solution B dans la solution A fraîchement préparée.

Etape (c) : Une solution C contenant des ions phosphate de sodium est obtenue par addition de 0,88 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( PM = 141,96 g, soit 6,23 millimoles de P) dans 25 cm<sup>3</sup>. On ajuste à pH 6 par HCl 1M. on additionne au mélange précédent la solution C, de manière instantanée

10 On réajuste l'ensemble réactionnel à pH 6  
L'ensemble est laissé sous agitation 5 min.

Etape (d) : On porte l'ensemble réactionnel dans une étuve préalablement chauffée à 50°C. La dispersion présente un aspect colloïdal après 16 heures à 50°C.

15

### **1-3/ Exemple 1-3 : Dispersion colloïdale de phosphate de calcium, d'agent complexant et de protéines laitières**

Etape (a) : Une solution A contenant des ions Ca<sup>2+</sup> est obtenue en dissolvant 2,75 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (PM = 147,02 g, soit 18,7 millimoles de Ca) dans de l'eau déminéralisée et addition de 26,5 cm<sup>3</sup> de complexant GBS 5 de formule développée NaCOO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-CH-(COONa) N (CH<sub>2</sub>COONa)<sub>2</sub> à 1,4 M, soit 37,4 millimoles de GBS 5. Le mélange possède un pH de 13. On ajuste à pH 6 par HCl 1M. Le volume final est de 35 cm<sup>3</sup>.

20 Etape (b) : Une solution B contenant des protéines laitières issues du lactosérum est obtenue en additionnant 1,87 g de protéines laitières à de l'eau déminéralisée. On complète à 25 cm<sup>3</sup> par de l'eau déminéralisée. On verse de manière instantanée la solution B dans la solution A fraîchement préparée.

Etape (c) : Une solution C contenant des ions phosphate de sodium est obtenue par addition de 0,88 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( PM = 141,96 g, soit 6,23 millimoles de P) dans 25 cm<sup>3</sup>.  
30 On ajuste à pH 6 par HCl 1M. On additionne au mélange précédent la solution C, de manière instantanée.

On réajuste l'ensemble réactionnel à pH 6.

L'ensemble est laissé sous agitation 5 min.

35 Etape (d) : On porte l'ensemble réactionnel dans une étuve préalablement portée à 50°C. La dispersion présente un aspect colloïdal après 16 heures à 50°C

## **2 / Préparation de nanoparticules lyophilisée**

### **2-1 / Exemple 2-1 : (HAP: Protéine soja ) = (1:1) en poids, pH 6**

- 5 La dispersion colloïdale obtenue à l'exemple 1-1 est lyophilisée.  
Par RMN solide du  $^{31}\text{P}$ , on observe un pic correspondant à un déplacement chimique de 3,4 ppm.

- 10 La poudre lyophilisée est redispersable dans l'eau déminéralisée. Par électronique à transmission on observe par cryo-microscopie (méthode Dubochet), des objets parfaitement individualisés, à répartition granulométrique monodisperse possédant une morphologie sphérique de taille d'environ 150 nm.

- 15 Les courbes de potentiels électrophorétiques ont montré un point isoélectrique pH 4 et une charge négative au pH des dispersions d'environ -19 mV

### **2-2 / Exemple 2-2 : (HAP: Protéine lysozyme) = (1:1) en poids, pH 6**

- 20 La dispersion colloïdale obtenue à l'exemple 1-2 est lyophilisée.  
Par RMN solide du  $^{31}\text{P}$ , on observe un pic correspondant à un déplacement chimique de 3,4 ppm.

- 25 La poudre lyophilisée est redispersable dans l'eau déminéralisée. Par électronique à transmission on observe par cryo-microscopie (méthode Dubochet), des objets parfaitement individualisés, à répartition granulométrique monodisperse possédant une morphologie sphérique de taille d'environ 150 nm.

- 30 Les courbes de potentiels électrophorétiques ont montré un point iso-électrique à pH 9 et une charge positive au pH des dispersions d'environ + 5 mV.

### **2-3 / Exemple 2-3 : (HAP: Protéine WPC ) = (1:1) en poids, pH 6**

- 35 La dispersion colloïdale obtenue à l'exemple 1-3 est lyophilisée.  
Par RMN solide du  $^{31}\text{P}$ , on observe un pic correspondant à un déplacement chimique de 3,4 ppm.

- La poudre lyophilisée est redispersable dans l'eau déminéralisée. Par électronique à transmission on observe par cryo-microscopie (méthode Dubochet), des objets

parfaitement individualisés, à répartition granulométrique monodisperse possédant une morphologie sphérique de taille d'environ 150 nm.

- 5 Les courbes de potentiels électrophorétiques ont montré un point isoélectrique à pH 4 et une charge négative au pH des dispersions d'environ - 18 mV.

### **3 / Préparation de particules calcinées**

#### **3-1/ Exemple 3-1: Essai à (HAP: Protéine WPC) = (3:1) en poids, pH 6**

- 10 La dispersion colloïdale est préparée comme à l'exemple 1-3 mais en utilisant 0,62 g de protéines laitières. Cette dispersion est lyophilisée. Puis on réalise une calcination flash à 900°C

La poudre obtenue de particules calcinées est constituée de phosphate de calcium et présente une morphologie isotrope en MET dont le rapport R est de 1,4.

- 15 Par RX, on observe une structure avec un mélange d'hydroxy-apatite, de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  et de  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .

**REVENDEICATIONS**

- 1 Dispersion colloïdale de nanoparticules de phosphate de calcium et d'au moins  
une protéine, et dont la taille desdites nanoparticules est comprise entre 50 à 300  
5 nm, et dont la morphologie desdites nanoparticules est sphérique.
- 2 Dispersion colloïdale selon la revendication 1 caractérisées en ce qu'elle  
comprend au moins un agent complexant du calcium.
- 10 3 Dispersion colloïdale selon l'une des revendications précédentes caractérisées en  
ce qu'elle comprend au moins un agent complexant du calcium possédant au  
moins une fonction carboxylate.
- 15 4 Dispersion colloïdale selon l'une des revendications précédentes caractérisées en  
ce qu'elle comprend au moins un agent complexant du calcium possédant au  
moins trois fonctions carboxylates.
- 20 5 Dispersion colloïdale selon l'une des revendications précédentes caractérisées en  
ce qu'elle comprend au moins un agent complexant du calcium possédant au  
moins quatre fonctions carboxylates.
- 25 6 Dispersion colloïdale selon l'une des revendications précédentes caractérisées en  
ce qu'elles comprennent au moins une protéine soluble.
- 30 7 Dispersion colloïdale selon la revendication 6 caractérisées en ce qu'elles  
comprennent au moins une protéine choisie dans le groupe constitué par les  
lysozymes, les protéines de soja, les protéines issues de la phase soluble du lait,  
les protéines issues des différents types de lactosérums.
- 35 8 Dispersion colloïdale selon l'une des revendications précédentes caractérisées en  
ce que les nanoparticules sont formées de cristallites élémentaires de diamètre  
compris entre 3 et 20 nm.
- 9 Nanoparticules caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par lyophilisation des  
dispersions colloïdales selon les revendications 1 à 8.

- 10      10      Nanoparticules selon la revendication 9 caractérisées en ce qu'elles sont redispersibles dans l'eau pour donner les dispersions colloïdales selon les revendications 1 à 8.
- 5      11      Dispersion colloïdale caractérisée en ce qu'elles sont obtenues par remise en suspension des nanoparticules selon les revendications 9 à 10.
- 12      12      Particules calcinées caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par calcination des nanoparticules selon la revendication 9 ou 10.
- 10      13      Particules calcinées selon la revendication 12 caractérisées en ce qu'elles présentent une isotropie comprise entre 1 et 1,5, mesurée par le rapport  $R = L / l$ .
- 15      14      Procédé de préparation du produit selon les revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 20      (a) on forme un mélange comprenant l'agent complexant du calcium et une source de calcium,
- (b) on ajoute au milieu issu de l'étape (a), au moins une protéine,
- (c) on ajoute au milieu issu de l'étape (b), une source de phosphore,
- (d) on chauffe le milieu issu de l'étape (c)
- 15      15      Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que le pH du milieu issu de l'étape (a) est ajusté de manière à obtenir un pH compris entre 5 et 7.
- 25      16      Procédé selon l'une des revendications 14 à 15 caractérisé en ce qu'avant l'addition de la source de phosphore selon l'étape (c), on ajuste le pH du milieu à une valeur comprise entre 4,5 et 8.
- 30      17      Procédé selon l'une des revendications 14 à 16 caractérisé en ce que l'étape (a) est réalisée avec un rapport molaire  $R_a = \text{agent complexant du calcium} / \text{calcium}$  compris entre 0,1 et 3.
- 35      18      Procédé selon l'une des revendications 14 à 17 caractérisé en ce que l'étape (c) est réalisée avec un rapport molaire  $R_b = \text{phosphate de calcium} / \text{protéine(s)}$  compris entre 0,3 et 6.



- 19 Procédé selon l'une des revendications 14 à 18 caractérisé en ce que l'étape (c) est réalisée avec un rapport massique  $R_c = \text{moles de calcium} / \text{mole de phosphore}$ , compris entre 1 et 4.
- 5 20 Utilisation des dispersions colloïdales obtenues selon l'une des revendications 1 à 8 ou des dispersions colloïdales obtenues par le procédé selon l'une des revendications 14 à 19 dans les industries alimentaires, cosmétiques, pharmacologiques.
- 10 21 Utilisation des nanoparticules selon les revendications 9 ou 10, ou des particules selon les revendications 12 ou 13 dans les industries alimentaires, cosmétiques, pharmacologiques.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter al Application No

PCT 03/01434

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 B01J13/00 C01B25/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 B01J C01B A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2 605 229 A (MARCUS JOSEPH K) 29 July 1952 (1952-07-29) column 11, line 47 -column 11, line 71; claims 1-8	1-21
A	US 3 027 229 A (RATCLIFF KARL A ET AL) 27 March 1962 (1962-03-27) examples 1,2,C	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 October 2003

Date of mailing of the international search report

09/10/2003

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Willsher, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC 03/01434

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2605229	A	29-07-1952	NONE	
US 3027229	A	27-03-1962	US 2967802 A	10-01-1961

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De internationale No

PC R 03/01434

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 B01J13/00 C01B25/32

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 B01J C01B A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2 605 229 A (MARCUS JOSEPH K) 29 juillet 1952 (1952-07-29) colonne 11, ligne 47 - colonne 11, ligne 71; revendications 1-8	1-21
A	US 3 027 229 A (RATCLIFF KARL A ET AL) 27 mars 1962 (1962-03-27) exemples 1,2,C	1-21

☐ 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
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 octobre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/10/2003

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

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

Fonctionnaire autorisé

Willsher, C

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres des familles de brevets

De: Internationale No

PC 03/01434

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2605229	A	29-07-1952	AUCUN	
US 3027229	A	27-03-1962	US 2967802 A	10-01-1961