

Brevet N° **85339**
 du **5 AVR. 1985**
 Titre délivré : **10 DEC. 1985**

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Intellectuelle
 LUXEMBOURG

16 DEC. 1985

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite: SANDOZ S.A., Lichtstrasse 35, CH-4002 Bâle, Suisse, (1)
 représentée par Monsieur Louis EMRINGER, avocat, demeurant à Luxembourg, (2)
 agissant en sa qualité de mandataire

dépose(nt) ce cinq avril 1985 quatre-vingt-cinq (3)
 à 16 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :
 1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant : (4)
Perfectionnements à la thérapie par l'interleukine

2. la délégation de pouvoir, datée de Bâle le 1 avril 1985
 3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;
 4. /// planches de dessin, en deux exemplaires;
 5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,
 le 3 avril 1985

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration que l'(es) inventeur(s) est (sont) : (5)
le déposant

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) (6)
Brevet déposée(s) en (7) Grande Bretagne
 le 9 avril 1984 (no. 8409125), le 9 avril 1984 (no. 8409126), le 9 avril 1984 (no. 8409127) le 9 avril 1984 (no. 8409128) (8)
 le 10 août 1984 (no. 8420381), le 19 septembre 1984 (no. 8423700) et le 19 septembre 1984 (no. 8423701)
 au nom de la déposante (9)
 élit(élient) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg (10)
14 a, rue des Bains, B.P. 472

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté de (11)
 annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à 6 mois (11)
 Le mandataire

Emringer

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

- 5 AVR. 1985

à 16 heures



Pr. le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes,
 p. d.

A 6600

(1) Nom, prénom, firme, adresse — (2) s'il a lieu, représenté par l'agissant en qualité de mandataire — (3) date et lieu de dépôt — (4) titre de l'invention — (5) noms et adresses — (6) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité — (7) date — (8) déposant originaire — (9) adresse — (10) 6, 12 ou 18 mois.

REVENDEICATION DE LA PRIORITÉ

de la demande de brevet

En Grande Bretagne

Du 9 avril 1984, du 9 avril 1984,

du 9 avril 1984, du 9 avril 1984,

du 10 août 1984, du 19 septembre 1984 et

du 19 septembre 1984

MÉMOIRE DESCRIPTIF

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

LUXEMBOURG

au nom de: SANDOZ S.A.

pour: Perfectionnements à la thérapie par l'interleukine

La présente invention concerne la thérapie par l'interleukine.

L'interleukine 2 (ci-après IL-2) est un facteur protéiné naturel découvert pour la première fois en 1976. Elle est
5 produite à partir des cellules T activées par un antigène ou lectine et constitue un facteur essentiel de la prolifération des cellules T. On a isolé des IL-2 de diverses structures à partir d'un certain nombre d'espèces animales, par exemple souris, primates comme le gibbon, le singe et l'homme. Les IL-2 humaines et d'autres ont été
10 purifiées à partir de diverses sources, telles que les lymphocytes de sang périphérique, les lymphocytes amygdaliens, les lymphocytes de la rate, les cellules T leucémiques et les cultures d'hybridomes de cellules T.

Comme indiqué ci-dessus, l'IL-2 est un facteur
15 essentiel à la prolifération des cellules T, elles-mêmes intimement impliquées dans les mécanismes de réponse immune de l'organisme. On suppose que l'IL-2 possède un potentiel thérapeutique extrêmement vaste. En particulier, elle peut être intéressante dans la thérapie des tumeurs, puisqu'elle conduit à la prolifération de cellules T
20 spécifiques d'un antigène, par exemple contre les antigènes tumoraux, et ces cellules T peuvent inhiber la croissance tumorale. On sait également que l'IL-2 induit la production de gamma-interféron et active les cellules tueuses naturelles. On s'attend également que l'IL-2 possède diverses applications contre les troubles immunolo-
25 giques, tels que les maladies néoplasiques, les infections bactériennes ou virales, les maladies immunodéficientes, les maladies d'auto-immunisation, etc. (voir B. Papermaster et autres, Adv. Immunopharm. (1980) 507).

Comme avec d'autres produits naturels comme les
30 interférons, l'IL-2 n'était disponible qu'en faibles quantités avant l'apparition du génie génétique.

Cependant, en suivant une méthodologie semblable à celle préalablement publiée pour d'autres protéines (par exemple le gamma-interféron), on a déterminé et exprimé la structure d'un gène
35 cloné pour l'IL-2 humaine (voir S. Taniguchi et autres, Nature (1983) 302, pages 305-310 et publication de brevet européen 91539

dont le contenu est incorporé à titre de référence. Cette IL-2 particulière est dénommée ci-après IL-2 connue.

On a déduit de la série de codage des nucléotides la série d'acides du polypeptide de l'IL-2 humaine, à savoir celle comprenant les acides numérotés de 1 à 153 dans la figure 3a de l'article de Nature ci-dessus. On a supposé, cependant, que les 20 premiers acides de cette série pouvaient être séparés lors de transports à travers une membrane. L-IL-2 humaine mûre consisterait alors en 133 acides commençant par l'Ala en position 21.

Cette structure de l'IL-2 humaine a été confirmée dans nos laboratoires et d'autres.

Il est également possible de produire des IL-2 de structures différentes en utilisant les techniques d'ADN recombinant. Par exemple, on peut produire des modifications du polypeptide de l'IL-2 humaine ayant un ou plusieurs acides absents ou remplacés par d'autres acides, par exemple comme décrit dans la publication de brevet européen mentionnée ci-dessus, en particulier pages 23 à 25, par modification correspondante du gène de l'IL-2 humaine. Par exemple, on peut, si on le désire, remplacer les résidus cystéine par d'autres acides, par exemple la sérine, comme décrit dans la publication de brevet européen 109748 au nom de Cetus et le brevet belge 898016, par exemple l'IL-2-sérine-125, dont le contenu est incorporé ici à titre de référence.

D'autres exemples de ces interleukines sont décrits dans la publication de brevet PCT W0 85/00817, dont le contenu est incorporé à titre de référence. Celles-ci comprennent l'IL-2 Gln-26, l'IL-2 Phe-121 et l'IL-2 Stop 121.

En outre, on peut produire des IL-2 de différentes sources comme le gibbon par des techniques à l'ADN recombinant et on peut aussi produire une modification de celles-ci de manière semblable. En outre, comme on l'a indiqué, les IL-2 peuvent être isolées (quoiqu'en quantités relativement faibles) à partir de sources naturelles et peuvent différer des produits obtenus par la technologie de l'ADN recombinant, par exemple dans la glycosylation. En outre, toutes les variantes peuvent être produites.

Les IL-2 peuvent aussi être produites par culture de cellules humaines, par exemple en présence d'un inducteur. On citera à titre d'exemples l'IL-2 A-1, l'IL-2 A-2, l'IL-2 B-1, l'IL-2 B-2 comme définies dans la demande de brevet danois n° 3317/84 et la publication de brevet européen n° 132359, dont le contenu est incorporé comme référence.

On entend ci-après par "interleukine" tout polypeptide y compris, mais sans limitation, ceux décrits ci-dessus, qu'ils soient isolés à partir de sources naturelles ou produits par une technique synthétique ou biosynthétique et qui possèdent une activité d'IL-2. Selon la présente invention, l'interleukine préférée est l'IL-2 humaine ou l'une de ses modifications, produite de préférence par des techniques à l'ADN recombinant. Des essais ont été effectués jusqu'à présent avec l'interleukine par injection, par exemple par voie intraveineuse. Ceux-ci ont montré par exemple que l'IL-2 a une très courte demi-vie de moins de 5 min. On a nettement besoin d'une forme parentérale d'interleukine à libération modifiée donnant une durée d'action suffisamment longue; cependant, il n'y a jusqu'à présent que peu de publications concernant des formulations galéniques spécifiques d'interleukines.

En outre, des essais effectués dans nos laboratoires ont montré que l'interleukine peut être incorporée dans des formes liposomiques qui présentent encore une activité d'IL-2 par administration par exemple par voie intraveineuse. En outre, les liposomes de la présente invention ont une demi-vie prolongée, ils sont passivement dirigés sur la cible dans la rate, le poumon, la moelle osseuse ou les ganglions lymphatiques.

La présente invention propose en conséquence des liposomes contenant de l'interleukine.

Les liposomes selon l'invention peuvent être préparés par encapsulation d'une interleukine dans une substance formant un liposome.

Les liposomes sont des membranes à double couche complètement fermées contenant une phase aqueuse avec l'interleukine. L'interleukine peut être dans la phase aqueuse et/ou dans la membrane. Ils peuvent être sous la forme de vésicule unilamellaire ou de vésicule

oligo ou multi-lamellaire sous la forme de doubles couches à membranes concentriques séparées chacune l'une de l'autre par une couche d'eau.

On peut les préparer par diverses techniques différentes - voir F. Szoka et D. Papahadjopoulos, "Liposomes and their uses in biology and medicine" Ann. N.Y. Acad. Sci. 308, 1-462, (1978); R.L. Juliano & D. Layton, "Liposomes as a drug delivery system" dans Drug delivery systems, pages 189-236, Oxford University Press, New York, 1980, dont la description est incorporée comme référence, mais le procédé de l'invention est préféré car il donne des liposomes ayant des propriétés particulièrement intéressantes. Ainsi, les liposomes produits par ce procédé sont spécialement stables, par exemple contre la fuite de l'interleukine, et le procédé de l'invention est approprié pour la production industrielle.

Les liposomes peuvent être fabriqués à partir de divers lipides capables de former des parois de vésicules. Les lipides préférés sont les phospholipides, tels que la lécithine naturelle (par exemple lécithine d'oeuf ou de soja), les lécithines synthétiques, les céphalines et les sphingomyélines. On peut également utiliser d'autres phosphatidylcholines, des acides phosphatidiques, les lysophosphatidylcholines, des sphingolipides, le phosphatidylglycérol, les cardiolipines, les glucolipides, les gangliosides et les cérébrosides.

Des exemples de lécithines comprennent les "EPIKURONS" fabriqués par Lucas Meyer, Hambourg 28, Allemagne Fédérale. La composition en phospholipides est, par exemple, la suivante : phosphatidylcholine 44-7%, phosphatidyléthanolamine 22-25%, phosphatidylinositol 0-2%, teneur en acides gras : saturés, acide palmitique 9-11%, acide stéarique 2-4%, insaturés, acide linoléique 63-67%, acide linolénique 5-8%, acide oléique 14-18%, connu sous le nom "EPIKURON 145 V". Un autre produit contient plus de 95% de phosphatidylcholine, par exemple 95-98%, et des acides principalement insaturés, par exemple acide oléique 10-12%, acide linoléique 62-65%, acide linolénique 5-6%, ainsi que des acides saturés, par exemple acide palmitique 15-17%, acide stéarique 3-4%, comme celui vendu sous le nom "EPIKURON 200".

On préfère qu'il y ait une teneur élevée en acides insaturés. On peut, si on le désire, utiliser une lécithine à teneur élevée en acides saturés, par exemple acide stéarique, et à 95% ou plus de phosphatidylcholine, par exemple "SOJA PHOSPHITID NC 95" ou des équivalents purs appropriés pour l'usage pharmaceutique, fournis par exemple
 5 par NATTERMANN CHEMIE GmbH, Cologne, Allemagne Fédérale.

Les phospholipides synthétiques peuvent contenir des portions aliphatiques modifiées, telles que des groupes hydroxyles, des chaînes carbonées ramifiées, des dérivés cycliques, des dérivés
 10 aromatiques, des éthers, des amides, des dérivés polyinsaturés, des dérivés halogénés ou des portions hydrophiles modifiées contenant des groupes carbohydrate, glycol, phosphate, phosphonate, ammonium quaternaire, sulfate, sulfonate, carboxy, amine, sulfhydryle et imidazole, par exemple comme dans les dérivés de dimyristoyl-,
 15 dipalmitoyl- ou distéaroyl-phosphatocoline.

Si on le désire, dans le liposome final, la double couche peut contenir, par exemple, jusqu'à 50 moles % d'autres lipides, par exemple des stéroïdes comme le cholestérol.

De préférence, le liposome final contient un stéroïde,
 20 tel que le cholestérol. Les rapports pondéraux appropriés lipide-stéroïde peuvent être de 6:1 à 1:1.

Si on le désire, la double couche peut comprendre une lécithine, par exemple la céphaline ou la sphingomyéline contenant jusqu'à 10 moles % d'un additif pour augmenter l'incorporation, par
 25 exemple des composés anioniques, tels que des acides, par exemple phosphate de dicétyle, acide phosphatidique, taurocholate de sodium, phosphatidylsérine (Merck) ou des composés cationiques, par exemple des amines, telles que la stéarylamine. On préfère utiliser la phosphatidylsérine (disponible chez Merck, Allemagne Fédérale).

30 Lorsque le lipide contient des excipients supplémentaires, il peut être préféré d'évaporer une solution du lipide et des excipients, par exemple dans le chlorure de méthylène dans un récipient réactionnel pour former un film lipidique sur la surface du récipient avant de mélanger le lipide avec l'interleukine.

35 Les liposomes peuvent être produits par des techniques bien connues, par exemple par traitement -----

par les ultrasons, en utilisant des conditions douces pour éviter la dégradation de l'interleukine. Des mélanges homogènes de lipides peuvent être produits par formation d'une solution de lipide, par exemple lécithine et cholestérol, dans un solvant organique convenable, par exemple le chloroforme. La solution est ensuite évaporée dans un récipient de réaction pour former un film lipidique.

Les liposomes peuvent être isolés et stérilisés de manière classique.

Dans les liposomes résultants selon l'invention, la concentration de l'interleukine est de préférence d'environ 5 à environ 500 µg/ml de phase aqueuse, de préférence de 20 à 200 µg/ml.

La concentration en lipide est de préférence d'environ 1 à environ 200 mg/ml de phase aqueuse, spécialement de 10 à 100 mg/ml.

Le diamètre moyen des liposomes pour l'utilisation ultérieure est de préférence d'environ 25 nm à 20 µm, de préférence de 100 à 500 nm.

La préparation finale de liposomes est de préférence stockée à basses températures, par exemple de -20 à +5°C.

En vue d'améliorer leur stockage, les liposomes selon l'invention peuvent être lyophilisés en une poudre sèche, par exemple par lyophilisation, en utilisant par exemple le mannitol, le saccharose, la polyvinylpyrrolidone ou la gélatine comme matière de support. Ceci peut être effectué dans les mêmes conditions que pour la lyophilisation indiquée ci-dessous dans l'étape Ab. Avant l'utilisation, on peut les reconstituer par addition d'eau stérile. On peut alors les mélanger avec des systèmes appropriés, par exemple pour l'injection intraveineuse ou la perfusion.

La pureté des liposomes peut être déterminée par des techniques analytiques classiques.

Les liposomes résultants peuvent, si on le désire, contenir un antioxydant, par exemple jusqu'à 1% du lipide, de préférence 0,1%. Des antioxydants préférés comprennent la vitamine E (acétate de tocophérol), le palmitate de vitamine C et le BHT (hydroxytoluène butylé).

D'autres stabilisants de l'interleukine peuvent être présents, par exemple un sucre, tel que mannitol, arabinose, sorbitol

ou saccharose, des albumines, par exemple la sérum-albumine humaine, etc. Ceux-ci peuvent être incorporés dans le tampon avant la formation du liposome. Ils sont présents de préférence jusqu'à 20 moles % en poids du lipide dans le liposome résultant.

5 Un procédé préféré pour la formation du liposome est le procédé a) suivant qui comprend

- Aa) la formation d'une solution d'une interleukine et d'un lipide dans un solvant organique,
- Ab) l'élimination du solvant de la solution pour donner un résidu,
- 10 Ac) la mise en suspension du résidu dans une solution d'un tampon,
- Ad) l'agitation et l'homogénéisation de la suspension jusqu'à production de liposomes, et
- Ae) l'isolement des liposomes.

Dans l'étape Aa), le terme "solution" couvre également
 15 les "pseudo-solutions" comme les suspensions. Cependant, on préfère produire une solution homogène, limpide. On peut utiliser n'importe quel solvant qui dissolve ou solubilise l'interleukine et le lipide. Le système peut être un solvant unique ou un mélange de solvants. Il peut contenir par exemple jusqu'à 15% d'eau. Le système solvant
 20 peut, si on le désire, contenir un tensioactif. Le système solvant peut comprendre n'importe quel solvant organique approprié qui puisse être éliminé du lipide par évaporation. On peut utiliser une grande variété d'éthers, tels qu'éther diéthylique et éther diisopropylique, d'esters tels que l'acétate d'éthyle, d'alcools tels
 25 que méthanol et tert-butanol et d'hydrocarbures halogénés tels que chlorure de méthylène et chloroforme. Si on le désire, le système solvant peut contenir de l'acide acétique. On préfère utiliser l'éther diéthylique, le chlorure de méthylène ou le tert-butanol.

Nous avons trouvé que le tert-butanol est préféré
 30 lorsque l'on utilise un vide poussé et le chlorure de méthylène avec un vide faible dans l'étape Ab).

Dans l'étape Ab), le solvant peut être éliminé par de nombreux moyens classiques en tenant compte de la sensibilité de l'interleukine. Des moyens préférés comprennent l'évaporation
 35 sous vide faible, par exemple 10 à 50 mm Hg, ou la lyophilisation sous vide poussé, par exemple à moins de 5 mm Hg, par exemple à 0,1 mm Hg.

Nous avons trouvé que la lyophilisation est spécialement préférée.

L'étape est avantageusement mise en oeuvre à une température inférieure à la température ambiante et le vide et la
 5 température sont réglés de telle manière que le mélange évaporé soit à environ 1-3°C au-dessous du milieu ambiant. Ce réglage peut s'effectuer de manière classique. Un programme typique de lyophilisation démarre à environ -60°C et la température augmente jusqu'à -15°C en 12 h. La température est ensuite augmentée à +10°C et
 10 maintenue pendant 2 h.

Dans l'étape Ac), le tampon utilisé est de préférence un tampon au phosphate, par exemple à pH 4-7, par exemple 5-6,5. La phase aqueuse est de préférence hypotonique, c'est-à-dire à moins de 300 milliosmoles/litre, spécialement moins de 290 milliosmoles/litre.
 15 La suspension résultante contient de préférence environ 0,001 à environ 0,2 g de lipide par ml.

Dans l'étape Ad), l'homogénéisation peut être obtenue par traitement par les ultrasons. Des fréquences convenables pour ce traitement peuvent être par exemple de 30 à 80 kHz. Une puissance
 20 typique est de 200 à 400 W pour environ 10 ml du mélange à homogénéiser ou à agiter. Bien entendu, on préfère que le mélange homogénéisé soit séparé de tout métal, tel que titane ou autre, associé avec le générateur d'ultrasons pour éviter la contamination par le métal.

25 La température est de préférence d'environ 10 à 70°C. On préfère la température ambiante pour les lipides insaturés et de 60 à 70°C pour les lipides saturés.

Pendant cette étape, il peut se former une émulsion de liposomes avec des agglomérats.

30 Si on le désire, le traitement par ultrasons peut être suivi d'agitation avec un agitateur mécanique à haute vitesse, par exemple à 10 000-27 000 tr/min. On préfère cependant supprimer cette étape et effectuer l'agitation également par les ultrasons dans les mêmes conditions que pour l'homogénéisation.

35 Dans l'étape Ae), les liposomes selon l'invention peuvent être isolés selon des techniques classiques, par exemple par

ultrafiltration, centrifugation, échange d'ions ou chromatographie sur gel, dialyse, etc. Les liposomes peuvent être filtrés et stérilisés à travers un filtre à petites ouvertures convenables, par exemple de 0,1 à 1 μm . Si on le désire, la filtration peut être effectuée au-dessus du point de transition de phase du lipide, par exemple de 30 à 70°C. Les liposomes sont de préférence isolés par centrifugation à vitesse élevée, par exemple à 10 000-20 000 g.

Un exemple du procédé a) est le suivant :

- a'a) mélange d'une solution hydrophile d'une interleukine avec un lipide dans un solvant organique,
- a'b) élimination de l'eau et du solvant organique par évaporation,
- a'c) reprise du résidu dans une solution tampon à pH 4-7 pour former une suspension,
- a'd) traitement de la suspension par les ultrasons pour former des liposomes, et
- a'e) isolement des liposomes.

Un autre exemple du procédé a) est le suivant :

- a'a) mélange d'une solution hydrophile d'une interleukine avec un lipide dans un solvant organique,
- a"b) lyophilisation du mélange pour donner un lyophilisat,
- a"c) mise en suspension du mélange de lyophilisation dans une solution d'un tampon (pH 4-7),
- a"d) agitation de la solution jusqu'à production de liposomes et/ou d'agglomérats,
- a"e) homogénéisation du mélange par des moyens mécaniques, et
- a"f) isolement des liposomes.

Ces procédés peuvent être mis en oeuvre de manière analogue au procédé a).

Selon un autre aspect, l'invention propose un procédé

- b) pour produire des liposomes contenant l'interleukine, qui comprend les étapes suivantes :
 - ba) mélange d'une solution à base aqueuse d'une interleukine et d'une solution organique d'un lipide,
 - bb) traitement du mélange par les ultrasons jusqu'à formation d'un peu de liposomes et/ou d'agglomérats, et
 - bc) récupération des liposomes du mélange, par exemple par

bi) élimination du solvant organique du mélange pour former une phase intermédiaire gélatineuse, et

bii) transformation de la phase intermédiaire gélatineuse en liposomes.

5 Dans l'étape ba), le terme "solution" vise également les "pseudo-solutions", telles que les émulsions. Cependant, on préfère produire une solution homogène, limpide. On peut utiliser n'importe quel système solvant qui dissolve ou solubilise le lipide. Le système peut être un solvant unique ou un mélange de solvants. Il
10 peut contenir, par exemple, jusqu'à 15% d'eau. Le système solvant peut contenir, si on le désire, un tensioactif. Le système solvant peut comprendre n'importe quel solvant organique approprié qui puisse être éliminé du lipide par évaporation. On peut utiliser une grande variété d'éthers comme l'éther éthylique et l'éther isopropylique,
15 d'esters comme l'acétate d'éthyle, d'alcools comme le méthanol et le tert-butanol et d'hydrocarbures halogénés comme le chlorure de méthylène ou le chloroforme.

Si on le désire, le système solvant peut contenir de l'acide acétique. On préfère utiliser le tert-butanol ou de
20 préférence l'éther éthylique ou le chlorure de méthylène.

L'interleukine peut être dissoute dans l'eau ou de préférence dans un système tampon aqueux à pH 4-7,4, par exemple à 5-6,5.

Le tampon aqueux est de préférence hypotonique,
25 c'est-à-dire à moins de 300 milliosmoles/litre, spécialement moins de 290 milliosmoles/litre. Le mélange résultant contient de préférence environ 0,001 à environ 0,2 g de lipide par ml.

Dans l'étape bb), le traitement du mélange peut s'effectuer par les ultrasons. Des fréquences convenables peuvent
30 être, par exemple, de 30 à 80 kHz. Une puissance typique est de 200 à 400 W pour chaque 10 ml du mélange traité. Bien entendu, on préfère que le mélange traité soit séparé de tout métal, tel que titane ou autre, associé au générateur d'ultrasons pour éviter la contamination par le métal.

35 La température est de préférence d'environ 10 à 70°C. On préfère la température ambiante pour les lipides insaturés et une température de 60-70°C pour les lipides saturés.

Pendant cette étape, il peut se former une émulsion de liposomes avec des agglomérats.

Les liposomes peuvent être récupérés de manière classique et l'on peut prévoir des étapes pour optimiser le rendement.

5 Dans l'étape i), le solvant organique est convenablement éliminé sous faible vide, par exemple de 10 à 600 mm Hg, tandis que la majeure partie de la phase aqueuse est encore conservée. On utilise de préférence de basses températures, par exemple la température ambiante ou des températures légèrement élevées, par
10 exemple à 45°C.

Dans l'étape ii), la phase intermédiaire gélatineuse résultante peut être traitée par l'eau, facultativement une solution tampon, comme décrit ci-dessus pour produire les liposomes.

Selon un autre aspect, l'invention propose un procédé c)
15 pour produire des liposomes contenant l'interleukine, qui comprend les étapes suivantes :

ca) mélange d'une interleukine, d'un tampon à base aqueuse à pH 4-8 et d'un lipide dans un solvant organique,

cb) traitement de la suspension résultante par les ultrasons pour
20 former des liposomes ou agglomérats, et

cc) récupération des liposomes du mélange, par exemple par

ci) évaporation du solvant du mélange, par exemple par une phase intermédiaire gélatineuse, et

cii) transformation de la phase intermédiaire gélatineuse en liposomes. Dans l'étape ca), le terme "solvant" vise également
25 les "pseudo-solutions" comme les émulsions. Cependant, on préfère produire une solution homogène, limpide. On peut utiliser n'importe quel système solvant qui dissout ou solubilise le lipide. Le système peut être un solvant unique ou un mélange de solvants. Il peut
30 contenir, par exemple, jusqu'à 15% d'eau. Si on le désire, il peut contenir un tensioactif. Le système solvant peut comprendre n'importe quel solvant organique approprié qui peut être éliminé du lipide par évaporation.

On peut utiliser une grande variété d'éthers comme
35 l'éther éthylique et l'éther isopropylique, d'esters comme l'acétate d'éthyle, d'alcools comme le méthanol et le tert-butanol et d'hydro-

carbures halogénés comme le chlorure de méthylène et le chloroforme. Si on le désire, le système peut contenir de l'acide acétique. On préfère utiliser l'éther éthylique, le chlorure de méthylène ou le tert-butanol.

- 5 L'interleukine peut être utilisée sous forme de poudre, par exemple ayant avantageusement une dimension maximale de particules de 60 μm de diamètre.

Dans l'étape ca), le tampon est de préférence un tampon au phosphate, par exemple à pH 4-7,4, tel que 4 à 7, par exemple 10 5-6,5. De préférence, la phase aqueuse est hypotonique, c'est-à-dire à moins de 300 milliosmoles/litre, spécialement moins de 290 milliosmoles/litre. La suspension résultante contient de préférence d'environ 0,001 à environ 0,2 g de lipide par ml.

Dans l'étape cb), le traitement peut être effectué par 15 les ultrasons. Des fréquences convenables sont par exemple de 30 à 80 kHz. Une puissance typique est de 200 à 400 W pour environ 10 ml du mélange traité. Bien entendu, on préfère que le mélange traité soit séparé de tout métal du type titane ou autre associé au générateur d'ultrasons pour éviter la contamination par le métal.

- 20 La température est de préférence d'environ 10 à 70°C. On préfère la température ambiante pour les lipides insaturés et une température de 60-70°C pour les lipides saturés.

Pendant cette étape, il peut se former une émulsion de liposomes avec des agglomérats.

- 25 Les liposomes peuvent être récupérés de manière classique et l'on peut prévoir des étapes pour optimiser les rendements en liposomes. Dans l'étape ci), le solvant organique est convenablement éliminé sous un faible vide, par exemple de 10 à 600 mm Hg, par exemple à la trompe à eau, tout en conservant la majeure partie de 30 la phase aqueuse. De préférence, on utilise de basses températures, par exemple la température ambiante ou des températures légèrement élevées, par exemple à 45°C.

Dans l'étape cii), on peut traiter la phase intermédiaire gélatineuse par l'eau, facultativement une solution de tampon 35 comme décrit ci-dessus pour produire les liposomes.

Il peut se former une suspension. Si on le désire, on peut effectuer une évaporation supplémentaire pour éliminer les traces de solvant organique et la formation de liposomes acides.

Les liposomes selon l'invention peuvent encore être
5 isolés selon des techniques classiques, par exemple comme dans l'étape ae) du procédé.

La pureté des liposomes peut être déterminée par des techniques classiques.

Pour déterminer l'incorporation de l'interleukine
10 dans les liposomes, le mélange brut de prépurification peut être dilué et centrifugé, par exemple pendant 3 à 24 h, et on détermine la quantité d'interleukine dans le surnageant.
L'interleukine restante est considérée comme incorporée dans le sédiment de liposomes.

En outre, on peut déterminer l'incorporation d'inter-
15 leukine dans les liposomes purifiés par des techniques chromatographiques en phase liquide à haute performance classiques, comme décrit dans les exemples ci-après.

On peut également suivre la distribution des liposomes
20 selon l'invention après l'administration par des techniques pharmacocinétiques classiques, par exemple dans des essais sur les animaux. On prépare l'interleukine radioactive par réaction d'iode 125 avec l'interleukine ou par production de l'interleukine à partir d'acides qui ont été marqués, par exemple par le soufre 35. On incorpore
25 cette interleukine dans des liposomes, qui sont produits à partir de lipides radioactifs marqués, par exemple par le carbone 14, et on l'injecte à des souris. Après 1 h, on sacrifie les souris et on mesure la quantité et le type de radioactivité dans chacun des organes, par exemple la rate.

Les liposomes de l'invention peuvent être utilisés
30 dans diverses applications connues des interleukines. Ces applications comprennent l'utilisation pour faciliter la croissance des cellules animales dans les cultures et d'autres applications in vitro et également l'utilisation thérapeutique dans le traitement de divers
35 états.

Dans un test ci-après dénommé test de dosage biologique, on effectue un dosage biologique de l'interleukine reposant sur la stimulation, dépendant de la concentration de l'interleukine, de la prolifération d'une série de lymphocytes T de souris (cellules CTLL, voir S. Gilles et autres J. Immunol. (1978), 120, pages 1027-2032).

On lave les cellules T d'une culture de cellules dépendantes de l'interleukine pour éliminer l'IL-2 et on les traite par des liposomes selon l'invention et on fait incuber dans un milieu sans IL-2. Les cellules d'essai sont ensuite soumises à un test classique de dilution en série (milieu de dilution RPMI-1640, additionné de 10% de sérum de fœtus de veau). On mesure la prolifération des cellules après 24 h d'incubation en fonction de la concentration croissante en liposomes. On utilise 2.10^5 cellules pour chaque dilution.

On mesure la prolifération par l'incorporation de [3 H]-thymidine ou par le test photométrique au MTT (MTT = bromure de 3'-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazoline). Le MTT jaune des cellules vivantes est transformé en formazanne bleu foncé correspondant qui est mesuré spectrophotochimiquement après dissolution dans l'isopropanol acide.

On mesure la dilution d'un échantillon donnant 50% du taux maximum de prolifération. L'activité des liposomes selon l'invention est d'environ 1,2 à 20 fois inférieure à celle de l'interleukine pure. De préférence, on utilise les liposomes qui ont une activité de plus de 1,3 ng/ml dans le test ci-dessus.

L'activité peut aussi être confirmée dans des tests classiques in vivo d'activité d'IL-2, par exemple chez des souris dont on a supprimé les lymphocytes T, par exemple des souris nudes. Dans un test, on produit ces souris par administration journalière de 90 mg/kg de cyclosporine A, après quoi on réduit de 80 à 97% après immunisation par des érythrocytes de mouton (GRM) le nombre de cellules d'anticorps spécifiques (PFC) dans la rate selon l'essai de Jerne de cellules formant plaques. Après injection i.v. de l'antigène, les souris sont divisées en deux groupes (6-7 animaux par groupe) et on leur administre des préparations d'IL-2 à des doses

contenant environ 2 à 5 microgrammes d'IL-2 par voie sous-cutanée ou de préférence par injection i.v. 2 fois par jour pendant 5 jours. On détermine la réapparition de l'immunité des animaux en mesurant le nombre de cellules d'anticorps spécifiques dans la rate selon le test de Jerne. L'activité des liposomes de l'invention est du même ordre que celle de l'interleukine non encapsulée.

On préfère utiliser les liposomes de l'invention dans des applications thérapeutiques d'intérêt particulier reposant sur les propriétés reconnues d'immuno-régulation des interleukines, par exemple comme mentionné à la page 1 de la présente description, en particulier leur utilisation dans le traitement d'états dus à des déficiences immunitaires comme le syndrome immunodéficitaire combiné grave (SIDCG), le syndrome immunodéficitaire acquis (SIDA), les états immunodéficitaires des vieillards et immunodéficitaires congénitaux. Cependant, l'interleukine peut aussi être utilisée comme agent antitumoral dans le traitement de diverses maladies virales comme les infections à cytomégalo virus et les infections à virus d'herpès et dans le traitement d'infections bactériennes, telles que tuberculose et lépre. Les doses nécessaires pour cette utilisation thérapeutique des liposomes varient selon des facteurs connus, tels que l'état traité, la gravité de l'état et la puissance et la quantité de l'interleukine incorporée, etc.

Cependant, on peut en général obtenir des résultats satisfaisants par administration à des mammifères, par exemple chez l'homme, à des doses journalières d'interleukine variant de 0,1 à 30 µg/kg de poids corporel. On préfère en général l'administration intraveineuse dans un véhicule stérile convenable.

Parmi la grande variété d'utilisations particulières de l'interleukine reposant sur son aptitude à provoquer la croissance des cellules T en culture, on citera celles qui trouvent des applications dans les diagnostics et comme auxiliaires dans les traitements thérapeutiques. L'utilisation dans les diagnostics repose sur l'aptitude connue à déceler la présence de certaines maladies par détermination du degré de croissance des lymphocytes T in vitro après addition de l'interleukine, en utilisant comme mesure l'absorption de la thymidine radioactive dans les cellules. Comme

auxiliaire dans les traitements thérapeutiques, par exemple un traitement antitumoral, l'interleukine peut être utilisée pour faciliter in vitro la croissance de lymphocytes T obtenus chez le patient ou chez un autre donneur compatible et les lymphocytes
 5 proliférants résultants sont ensuite réinjectés au patient pour aider à combattre son état. En général, la quantité d'interleukine à utiliser pour faciliter la croissance des cellules T en culture et dans d'autres applications in vitro peut être déterminée d'après les données générales de la littérature sur son activité et sa compa-
 10 raison avec l'interleukine humaine dans ces systèmes, et peut être optimisée pour des conditions particulières par des études classiques.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

Le terme "lécithine" s'entend ci-après pour désigner la lécithine de soja.

15 Le traitement par les ultrasons s'effectue à 50 kHz et 350 W, sauf autre indication.

PROCEDE A

EXEMPLE A1 : Préparation de liposomes

On dissout 2 mg d'IL-2 humaine dans 1 ml d'acide
 20 acétique. On dissout séparément 1 g de lécithine purifiée dans 5 ml de tert-butanol. On mélange ensemble les deux solutions et on lyophilise à -30°C pour donner un lyophilisat. On reprend le lyophilisat par un tampon au phosphate 0,05 M (pH 5) jusqu'à 10 ml pour donner une suspension.

25 On traite la suspension par les ultrasons dans un bain pendant 5 min. On homogénéise ensuite la suspension pendant 15 min avec un agitateur à grande vitesse à 15 000 tr/min (Type Polytron 10-30) sous atmosphère d'azote.

On essore ensuite la solution de liposomes sur un
 30 filtre stérile (0,2 µm) à une température supérieure au point de transition de phase de la lécithine, par exemple à 20°C. On lyophilise ensuite la solution de liposomes résultante.

Si on le désire, on peut supprimer l'étape avec
 35 l'agitateur à grande vitesse et continuer le traitement aux ultrasons pendant 15 min et/ou isoler les liposomes par centrifugation.

ANALYSE DES LIPOSOMES

On peut analyser les liposomes de l'invention en utilisant des techniques classiques de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) à inversion de phase.

- 5 On préfère utiliser un matériau de support hydrocarboné C-8 sphérique à pores larges (environ 300 Å) de 10 µm (par exemple colonne de 20 x 4,6 mm d'Aquapore RP 300 fournie par Browlee Laboratories Inc. USA).

- 10 Un système éluant préféré est un gradient eau/acétonitrile avec 0,1% d'acide trifluoroacétique, par exemple utilisant deux systèmes éluants.

Système A : acétonitrile à 50% dans H₂O (+ 0,1% d'acide trifluoroacétique)

- 15 Système B : acétonitrile à 70% dans H₂O (+ 0,1% d'acide trifluoroacétique).

- 20 Les débits typiques sont de 3 ml/min avec un gradient du système à 100% de A au système à 100% de B en 10 min. Dans ces conditions préférées, l'IL-2 humaine est éluee avec une durée de rétention d'environ 7,5 min et la quantité d'interleukine peut être obtenue par intégration du pic de manière classique.

Les liposomes de l'invention sont prétraités avant la CLHP.

- 25 i) par dilution par le tampon à l'acétate à pH 2,5-4 puis dégradation des liposomes sur la colonne de CLHP libérant l'interleukine,
 ii) par élimination exhaustive de l'excipient des liposomes de l'interleukine incorporée dans les liposomes, par exemple l'eau et le mélange méthanol/chlorure de méthylène pour éliminer les phospholipides et ensuite injection de la solution aqueuse résultante contenant l'interleukine,
 30 iii) par la technique de commutation des colonnes où on sépare les excipients des liposomes de l'interleukine incorporée dans les liposomes de l'invention sur une résine échangeuse de cations. Ensuite, on élue l'interleukine à partir de la résine échangeuse de cations sur une colonne à inversion de phase où elle est chromatographiée de la manière habituelle.
 35

Une colonne échangeuse de cations appropriée est une colonne de 30 mm x 4,6 mm garnie avec un support de 10 μ m (par exemple SC x 10 fournie par Browlee Laboratories Inc. USA).

On trouve que l'IL-2 humaine est incorporée à 50% environ dans les liposomes.

ACTIVITE ET UTILITE

On trouve que les liposomes ont à peu près une activité du même ordre que l'IL-2 elle-même dans le test de dosage biologique mentionné ci-dessus.

10 EXEMPLE A2 : Préparation des liposomes (V3)

On dissout 0,5 mg d'IL-2 humaine dans 1 ml d'acide acétique. On dissout séparément 500 mg de lécithine (EPIKURON 145 V) dans 50 ml de t-butanol. On mélange les deux solutions ensemble et on lyophilise à -15°C en environ 16 h pour obtenir un lyophilisat.

15 On reprend le lyophilisat par un tampon au phosphate 0,05 M (pH 6,5) jusqu'à 10 ml pour donner une suspension.

On traite la suspension par les ultrasons dans un bain pendant 5 min à la température ambiante (environ 20°C). On homogénéise ensuite la suspension pendant 10 min avec un agitateur à grande vitesse à environ 15 000 tr/min (Type Polytron PT 15) à la température ambiante.

On isole les liposomes par centrifugation à 150 000 g à 4°C pendant 4 h.

EXEMPLE A3 : Préparation des liposomes

25 On répète l'exemple A2 avec traitement par les ultrasons et homogénéisation par l'agitateur à grande vitesse à 70°C au lieu de la température ambiante. La lécithine utilisée est le "Soja phosphatid NC 95 H". La durée de centrifugation est de 2 h.

EXEMPLE A4 : Préparation des liposomes

30 On mélange ensemble 0,5 mg d'IL-2 humaine, 450 mg de lécithine (EPIKURON 145 V) et 50 mg de phosphatidylsérine dans 10 ml de t-butanol et on traite aux ultrasons pendant 10 min à la température

ambiante pour former une solution. On lyophilise la solution à -40°C en environ 18 h pour former un lyophilisat.

On reprend le lyophilisat par un tampon au phosphate 0,05 M (pH 6,3) jusqu'à 10 ml pour donner une suspension. On traite la suspension par les ultrasons dans un bain pendant 10 min à la température ambiante (20°C) et ensuite on l'homogénéise comme à l'exemple 2 pendant 10 min. On isole les liposomes par centrifugation à 150 000 g à 4°C pendant 4 h.

EXEMPLE A5 : Préparation des liposomes

10 On répète l'exemple A4 en utilisant 500 mg de lécithine au lieu de 450 mg de lécithine et 50 mg de phosphatidylsérine.

EXEMPLE A6 : Préparation des liposomes

On répète l'exemple A4 en utilisant 425 mg de lécithine et 75 mg de cholestérine au lieu de 450 mg de lécithine et 50 mg de
15 phosphatidylsérine.

EXEMPLE A7 : Préparation des liposomes

On répète l'exemple A2 sans l'étape d'agitation à grande vitesse. On continue le traitement par les ultrasons pendant 15 min.

20 EXEMPLE A8 : Préparation des liposomes

On répète chacun des exemples A3-6 sans l'étape d'agitation à grande vitesse.

ANALYSE DES LIPOSOMES

Liquide surnageant

25 On analyse le liquide surnageant après centrifugation par des techniques de chromatographie liquide à haute performance à inversion de phase comme décrit ci-dessus : il contient moins de 10% de l'IL-2 humaine initiale.

Activité biologique

On analyse les liposomes selon le test de dilution en série pour déterminer l'incorporation de [^3H]-thymidine dans des cellules CTLL-(16) dépendantes de l'IL-2, dans le test décrit ci-dessus (S. Gilles et autres). On mesure immédiatement après la préparation la concentration d'IL-2 qui produit 50% de la croissance maximale de 10^4 cellules après 24 h (valeur A en ng/ml). Dans ce test, l'IL-2 humaine elle-même utilisée comme matière première pour la formation des liposomes a une valeur de 0,2 ng/ml.

10 Résultats

Exemple	A° (ng/ml)	A ² (ng/ml)	A ⁴ (ng/ml)*
A2	0,2	0,7	3,2
A3	9,5	8,4	nd
A4	0,7	nd	nd
15 A5	2,6	nd	nd
A6	1,6	nd	nd
A7**	1,0	nd	nd

* stockage après 4 semaines à 4°C

** charge d'IL-2 initiale, activité 0,8 ng/ml

20 nd = non déterminée

Dans le test in vivo ci-dessus, on obtient les résultats suivants avec un lot stocké de liposomes de l'exemple A2 ayant une activité in vitro de 1,7 ng/ml dans le test ci-dessus :

25		Dose en µg	PFC dans la rate	Activité relative par rapport au témoin
	Souris immunisée, avec lymphocytes T (témoin)	-	167 000	100%
	Souris sans lymphocytes T	-	28 000	17%
30	Substance IL-2	5	111 000	66%
	Liposomes	5	96 700	58%
	Substance IL-2	2	96 700	58%
	Liposomes	2	87 100	52%

EXEMPLE A9 : Préparation des liposomes

On dissout 0,5 mg d'IL-2 humaine dans 1 ml d'acide acétique et on ajoute la solution à une solution de 500 mg de lécithine (EPIKURON 145 V) dans 50 ml de chlorure de méthylène.

- 5 On évapore le mélange dans un évaporateur rotatif à 30°C sous un vide de 10 à 50 mm Hg pendant 1 h et ensuite à 50°C pendant 3 h pour donner un film lipidique. On disperse le film dans 10 ml de tampon au phosphate (0,02 M) à pH 5. On traite ensuite la dispersion dans un bain ultrasonique pendant 30 min à la température ambiante (20°C) pour former des liposomes.

On isole les liposomes par centrifugation à 15 000 g à 40°C pendant 4 h.

EXEMPLE A10 : Préparation des liposomes

- 15 On répète l'exemple A9 avec le traitement par les ultrasons à 70°C au lieu de la température ambiante. La lécithine utilisée est le "Soja phosphatid NC 95 H". La centrifugation est effectuée pendant 2 h.

ANALYSE DES LIPOSOMES

Analogue à l'analyse effectuée pour l'exemple A4.

20 Résultats

Exemple	A° (ng/ml)	A ² (ng/ml)
A9	0,8	0,9
A10	2,5	3,5

PROCEDE B25 EXEMPLE B1 : Préparation des liposomes

- On dissout 100 mg de lécithine dans 5 ml de chlorure de méthylène dans un ballon à fond rond. On ajoute une solution aqueuse de 0,2 mg d'IL-2 humaine et 20 mg de L-cystéine dans 1 ml de tampon au phosphate 0,05 M (pH 5). On émulsifie le mélange dans un bain ultrasonique pendant 5 min à 20°C (fréquence 80 kHz).

On concentre ensuite l'émulsion (contenant un peu des liposomes et agglomérats préformés) à 20°C sous vide (20 à 30 mm Hg) pour donner un gel auquel on ajoute 2 ml de la solution

tampon en agitant lentement le mélange. On obtient une suspension aqueuse de liposomes.

On sépare les liposomes de l'agent actif non incorporé par les étapes suivantes :

- 5 a) centrifugation (5 min, 20°, 5000 G). L'agent actif non incorporé reste dans le liquide surnageant et le sédiment de liposomes est remis en suspension,
- b) chromatographie sur colonne de gel (Biogel A 1,5 ou Séphadex G 50). L'éluat contenant les liposomes est concentré par ultrafiltration
- 10 ou dialyse contre une solution de saumure à 0,9%.

On lyophilise la suspension de liposomes résultante.

ANALYSE

On trouve que l'IL-2 humaine est incorporée à environ 50-90% dans les liposomes.

15 ACTIVITE ET UTILITE

On trouve que les liposomes ont une activité du même ordre que celle de l'IL-2 humaine elle-même dans le test de dosage biologique mentionné ci-dessus.

EXEMPLE B2 : Préparation des Liposomes

- 20 On dissout 500 mg de lécithine (EPIKURON 145 V) dans 200 ml de chlorure de méthylène dans un ballon à fond rond. On ajoute une solution aqueuse de 0,5 mg d'IL-2 humaine et 100 mg de L-cystéine dans 10 ml de tampon au phosphate 0,05 M (pH 5).

- On émulsifie le mélange dans un bain ultrasonique
- 25 pendant 10 min à la température ambiante (20°C). On concentre ensuite l'émulsion résultante (contenant un peu des liposomes et agglomérats préformés) à 35°C pendant 10 min sous vide (20 à 30 mm Hg) pour donner un gel auquel on ajoute 10 ml de solution tampon. On agite le mélange pendant 30 min à la température ambiante.

- 30 On isole les liposomes par centrifugation à 150 000 g à 4°C pendant 4 h.

EXEMPLE B3 : Préparation des liposomes

On opère de manière analogue à l'exemple B2, mais on concentre à 80°C pendant 5 min au lieu de 35°C pendant 10 min. La lécithine utilisée est du 'Soja phosphate NB 95 H'. On effectue la centrifugation pendant 2 h au lieu de 4 h.

EXEMPLES B4 et B5 : Préparation des liposomes

On opère de manière analogue aux exemples 2 et 3, mais sans L-cystéine.

ANALYSE DES LIPOSOMES10 Liquide surnageant

Après centrifugation, on analyse le liquide surnageant par des techniques de chromatographie liquide à haute performance à inversion de phase comme décrit ci-dessus : il contient moins de 10% de l'IL-2 humaine initiale.

15 Activité biologique

On analyse les liposomes selon le test de dilution en série décrit ci-dessus (S. Gilles et autres) pour déterminer l'incorporation de la [^3H]-thymidine dans des cellules CHL-(16) dépendantes de l'IL-2. On mesure la concentration d'IL-2 qui produit 50% de la croissance maximale de 10^4 cellules après 24 h immédiatement après la préparation (valeur A^0 en ng/ml) et après 2 semaines de stockage à 4°C (valeur A^2 en ng/ml). Dans ce test, l'IL-2 elle-même a une valeur de 0,2 ng/ml.

Résultats

25	Exemple	A^0 (ng/ml)	A^2 (ng/ml)
	B2	0,8	2,4
	B3	20,0	35,0

PROCEDE CEXEMPLE C1 : Préparation des liposomes

30 On dissout 50 micromoles de lécithine purifiée et 50 micromoles de cholestérol dans 20 ml de chloroforme et on évapore dans un évaporateur rotatif sous azote. On reprend le résidu dans

5 ml d'éther éthylique. On ajoute 600 µg d'IL-2 humaine (en poudre, par exemple dimension de particules 5 à 50 µm). On ajoute à cette solution 1,5 ml de tampon au phosphate 0,05 molaire.

On traite ensuite le mélange avec une sonde à ultrasons à 5°C pendant 5 min pour donner un homogénéisat. On concentre l'émulsion résultante dans un évaporateur rotatif en deux stades. Dans le premier stade, la pression est d'environ 400 mm Hg et on la maintient jusqu'à obtenir un gel visqueux. On traite ce gel par 1,5 ml de tampon au phosphate 0,05 M (pH 5) et on secoue légèrement le récipient pour obtenir une suspension aqueuse. On soumet ensuite la suspension aqueuse à une seconde étape d'évaporation à la température ambiante sous pression normale pendant 15 min pour obtenir une suspension de liposomes non transparente.

Pour éliminer les dernières traces de solvant organique, on peut effectuer une ultrafiltration sur une colonne échangeuse d'ions (Séphadex 650).

ANALYSE DES LIPOSOMES

On trouve que l'IL-2 humaine est incorporée à environ 50-90% dans les liposomes.

20 ACTIVITE ET UTILITE

On trouve que les liposomes ont une activité du même ordre que l'IL-2 humaine elle-même dans le test de dosage biologique mentionné ci-dessus.

25 EXEMPLE C2 : Préparation des liposomes

On dissout 500 mg de lécithine (EPIKURON 145 V) et 0,5 mg d'IL-2 humaine dans 20 ml de chlorure de méthylène. On ajoute 10 ml de tampon au phosphate 0,05 molaire.

On traite ensuite le mélange dans un bain à ultrasons pendant 5 min à la température ambiante (environ 20°C). On concentre l'émulsion résultante dans un évaporateur rotatif à 35°C pendant 10 min, jusqu'à obtenir un gel visqueux. On ajoute ensuite 10 ml de solution tampon au phosphate 0,05 M (pH 5) et on fait tourner le récipient pendant 30 min à la température ambiante.

On isole les liposomes par centrifugation à 150 000 g à 4°C pendant 4 h.

EXEMPLE C3 : Préparation des liposomes

On répète l'exemple C2 en concentrant à 80°C pendant 5 min au lieu de 35°C pendant 10 min. La lécithine est le "Soja phosphatic NC 95 H". On effectue la centrifugation pendant 2 h.

ANALYSE DES LIPOSOMES

Liquide surnageant

Après centrifugation, on analyse le liquide surnageant par les techniques de chromatographie liquide à haute performance à inversion de phase comme décrit ci-dessus : il contient moins de 10% de l'IL-2 humaine initiale.

Activité biologique

On analyse les liposomes selon le test de dilution en série décrit ci-dessus (S. Gilles et autres) pour déterminer l'incorporation de la [3 H]-thymidine dans les cellules CHLL-(16) dépendantes de l'IL-2. On détermine la concentration d'IL-2 qui produit 50% de la croissance maximale de 10^4 cellules après 24 h immédiatement après la préparation (valeur A^0 en ng/ml) et après stockage pendant 2 semaines à 4°C (valeur A^2 en ng/ml). Dans ce test, l'IL-2 humaine elle-même a une valeur de 0,2 ng/ml.

Résultats

Exemple	A^0 (ng/ml)	A^2 (ng/ml)
C2	1,2	2,9
25 C3	12,5	20,0

Dans l'un quelconque des exemples ci-dessus des procédés A, B et C, l'IL-2 humaine peut être remplacée par l'IL-2 sérine 125, l'IL-2 A-1, l'IL-2 A-2, l'IL-2 B-1, l'IL-2 B-2, l'IL-2 Gln 26, l'IL-2 Phé-121 ou l'IL-2 Stop 121.

REVENDICATIONS

1. Liposomes contenant de l'interleukine.
2. Liposomes selon la revendication 1, caractérisés en ce que l'interleukine est l'IL-2 humaine.
- 5 3. Liposomes selon la revendication 1, caractérisés en ce que l'interleukine est l'IL-2 sérine 125.
4. Liposomes selon la revendication 1, caractérisés en ce que l'interleukine est l'IL-2 A-1, l'IL-2 A-2, l'IL-2 B-1 ou l'IL-2 B-2.
- 10 5. Liposomes selon la revendication 1, caractérisés en ce que l'interleukine est l'IL-2 Gln-26, l'IL-2 Phé-121 ou l'IL-2 Stop-121.
6. Procédé perfectionné d'administration d'une interleukine à un sujet ayant besoin d'un traitement par l'interleukine,
15 caractérisé en ce qu'il consiste à administrer par voie intraveineuse un liposome contenant une interleukine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.
7. Procédé pour produire des liposomes contenant une interleukine, caractérisé en ce qu'il consiste
20 a) à former une solution d'une interleukine avec un lipide dans un solvant organique,
b) à éliminer le solvant de la solution pour donner un résidu,
c) à mettre le résidu en suspension dans une solution d'un tampon,
d) à agiter et homogénéiser la suspension jusqu'à production des
25 liposomes, et
e) à isoler les liposomes.
8. Procédé pour produire des liposomes contenant une interleukine, caractérisé en ce qu'il consiste
a) à mélanger une solution aqueuse d'une interleukine et une solution
30 organique d'un lipide,
b) à traiter le mélange par les ultrasons jusqu'à ce qu'il se forme des liposomes et/ou agglomérats, et
c) à récupérer les liposomes du mélange.

9. Procédé pour produire des liposomes contenant une interleukine, caractérisé en ce qu'il consiste
- a) à mélanger une interleukine, un tampon à base aqueuse à pH 4-8 et un lipide dans un solvant organique,
- 5 b) à traiter la suspension résultante par les ultrasons pour former des liposomes ou agglomérats, et
- c) à récupérer les liposomes du mélange.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le tampon a un pH de 4 à 7.
- 10 11. Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que l'on récupère les liposomes par
- i) évaporation du solvant du mélange pour former une phase intermédiaire gélatineuse, et
 - ii) conversion de la phase intermédiaire gélatineuse en liposomes.
- 15 12. Procédé pour produire des liposomes contenant une interleukine, caractérisé en ce qu'il consiste
- a) à mélanger une solution hydrophile d'une interleukine avec un lipide dans un solvant organique,
 - b) à éliminer l'eau et le solvant organique par évaporation,
- 20 c) à reprendre le résidu dans une solution tampon à pH 4-7 pour former une suspension,
- d) à traiter la suspension par les ultrasons pour former des liposomes, et
 - e) à isoler les liposomes.
13. Procédé pour produire des liposomes contenant une
- 25 interleukine, caractérisé en ce qu'il consiste
- a) à mélanger une solution hydrophile d'une interleukine avec un lipide dans un solvant organique,
 - b) à lyophiliser le mélange pour donner un lyophilisat,
 - c) à mettre le mélange lyophilisé en suspension dans une solution
- 30 d'un tampon (pH 4-7),
- d) à agiter la solution jusqu'à production des liposomes et/ou agglomérats,
 - e) à homogénéiser le mélange par des moyens mécaniques, et
 - f) à isoler les liposomes.
- 35 14. Liposomes, caractérisés en ce qu'ils sont produits par un procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 13.