



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1005952A4

NUMERO DE DEPOT : 09200502

Classif. Internat. : A61K

Date de délivrance le : 05 Avril 1994

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 01 Juin 1992 à 11H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SANDOZ S.A.
Lichtstrasse 35, CH-4002 BALE(SUISSE)

représenté(e)(s) par : WYMANN Gérard, SANDOZ A.G., Département des Brevets et Marques - CH 4002 Bale SUISSE.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : LIPOSOMES.

PRIORITE(S) 30.05.91 GB GBA 9111611

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 05 Avril 1994
PAR DELEGATION SPECIALE :

G. DE CUYPERE
Secrétaire d'administration

Liposomes

La présente invention concerne des liposomes contenant de l'allylamine, c'est-à-dire, des liposomes chargés d'un composé d'allylamine à titre d'agent pharmacologiquement actif. La présente invention vise dans un premier aspect des liposomes comprenant un composé de formule I

Voir formule I

Le composé de formule I peut être utilisé, par exemple, sous forme libre ou sous forme de sel d'addition avec un acide. Un sel d'addition avec un acide peut être préparé à partir de la forme de base libre de manière classique et vice-versa. Comme exemples de sels d'addition avec des acides appropriés, on peut citer le chlorhydrate, le lactate et l'ascorbate.

Le composé de formule I est décrit, par exemple, dans les documents BE-A-853.976 et EP-A-24.587. Il appartient à la classe des anti-mycotiques d'allylamine. Il est connu dans la technique sous le nom général de terbinafine et se trouve dans le commerce sous la marque déposée LAMISIL. Si la terbinafine est très active à la fois par administration topique et orale, in vitro, le sérum peut contrarier dans une certaine mesure son activité fongicide.

Il est donc souhaitable de trouver un système délivreur de médicament susceptible d'améliorer la biodisponibilité du composé de formule I afin de pallier la liaison avec le sérum et/ou influencer favorablement des paramètres tels que la pharmacocinétique et la répartition dans les tissus et/ou réduire les effets secondaires et la toxicité. La réduction des effets secondaires et de la toxicité avec le maintien ou l'augmentation de l'activité et du rendement thérapeutique de la substance médicamenteuse est recherchée.

Une approche prometteuse répondant aux critères mentionnés ci-dessus a à présent été découverte sous la forme de liposomes comprenant le composé de formule I à titre d'agent actif. Une forme de dosage acceptable pharmaceutiquement, par exemple, parentérale pour le composé lipophile de formule I a ainsi été obtenue à l'aide de préparations liposomiques. Aucun agent tensio-actif n'est nécessaire de ce fait et on évite ainsi les problèmes d'effets secondaires additionnels couramment associés à leur usage.

Une application pulmonaire des liposomes comprenant le composé de formule I, par exemple, par un inhalateur à dose mesurée (MDI), un aérosol aqueux ou pulvérulent, peut entraîner une libération immédiate ou progressive du composé de formule I, selon la composition liposomique, pour produire l'activité fongicide. Une application topique des liposomes contenant le composé de formule I peut entraîner une meilleure accumulation du médicament sur le site d'administration, ce qui entraîne à son tour un rendement plus élevé du composé de formule I par comparaison avec des formes d'application non liposomiques. En application pulmonaire, les liposomes comprenant un composé de formule I sont efficaces

contre les affections fongiques du poumon telles que la candidose et divers types d'aspergillose, par exemple, des infections dues à l'*Aspergillus fumigatus* et aux *Aspergilli non-fumigatus*.

Une application par injection de liposomes selon la présente peut entraîner un meilleur rendement de l'agent actif par comparaison à la même quantité du même agent lorsqu'il est injecté sous une forme injectable classique. Par ailleurs, un rendement équivalent du composé de formule I peut être obtenu avec une moindre quantité de l'agent actif lorsqu'il est administré sous forme de liposomes portant le composé de formule I. Une réduction sensible de la quantité requise du composé de formule I pour le traitement d'une affection fongique peut être obtenue de cette manière.

Les liposomes sont des vésicules lipidiques qui sont formées par addition d'une solution aqueuse à un film sec de phospholipides, par exemple, si nécessaire avec addition d'énergie, voire même dans une certaine mesure spontanément. Le lipide le plus largement utilisé est la phosphatidylcholine. En modifiant la composition des lipides, la taille, la charge et la fluidité de la membrane des liposomes, on peut fortement influencer leur distribution dans le corps. Des molécules de médicament peuvent soit être encapsulées dans l'espace aqueux, soit être intercalées dans la bicouche. Au cours des deux dernières décennies, les liposomes ont été appliqués à une série de médicaments, mais également à la matière génétique, à des enzymes et à d'autres (macro)molécules sous la forme de véhicules délivreurs dans des cellules vivantes et d'autres barrières hydrophobes en pharmacologie, en médecine, en génie génétique, dans l'industrie des cosmétiques et dans l'industrie alimentaire. Dans le traitement des

affections fongiques systémiques, ces vésicules ont été également utilisées avec succès comme supports de l'Amphotéricine B et de la nystatine.

Abréviations

AMB	Amphotéricine B
DMPC	Dimyristoyl-phosphatidyl-choline
DMPG	Dimyristoyl-phosphatidyl-glycérol
DOPC	Dioléoyl-phosphatidyl-choline
DOPG	Dioléoyl-phosphatidyl-glycérol
DOPS	Dioléoyl-phosphatidyl-sérine
DPPC	Dipalmitoyl-phosphatidyl-choline
DSPC	Distéaroyl-phosphatidyl-choline
DSPG	Distéaroyl-phosphatidyl-glycérol
GPC	Chromatographie par perméation de gel
HEPES	Acide hydroxy éthyl pipérazine éthane sulfonique
HPC	Phosphatidyl choline hydrogénée
HPLC	Chromatographie en phase liquide de haute performance
IR/ATR	Spectroscopie par réflexion totale atténuée aux infra-rouges
MDI	Inhalateur à dose mesurée
MLV	Vésicule multilamellaire
PC	Phosphatidyl-choline
PE-PEG	Phosphatidyléthanolaminepolyéthylène glycol
PG	Phosphatidyl-glycérol

POPC	Palmitoyl-oléoyl-phosphatidyl-choline
POPG	Palmitoyl-oléoyl-phosphahtidyl-glycérol
PS	Phosphatidyl-sérine

TC	Température de transition de phase
----	------------------------------------

Explication des figures

Figure 1 : Profil d'élution d'un mélange de 0,4 mg de composé libre de formule I et de 1,0 mg de liposomes selon la présente invention [se référer à l'exemple 1,a)].

Figure 2 : Modélisation d'ordinateur montrant l'orientation du composé de formule I et du POPC dans des membranes multibicouches [se référer à l'exemple 1,h)].

Figure 3 : Dépôt de composé de formule I dans les divers compartiments du Twin Impinger après nébulisation de suspensions liposomiques.

Figure 4 : Taille particulière de liposomes à l'intérieur du nébulisateur.

Les liposomes selon la présente invention peuvent être obtenus par un procédé qui consiste à encapsuler un composé de formule I avec une matière formatrice de liposomes appropriée. Ce procédé constitue un autre aspect de la présente invention.

Le procédé de l'invention peut être réalisé de manière classique, par exemple, dans des lignes générales similaires aux procédures décrites dans F. Szoka et D. Papahadjopoulos, "Liposomes and their uses in biology and medicine", Ann N.Y. Acad. Sci. 308 (1978) 1-462, dans R.L. Juliano & D. Layton, "Liposomes as a drug delivery system" dans Drug Delivery Systems, Oxford University Press, Inc., New-York (1980) p.

189-236, dans M.J. Ostro, Liposomes, M. Dekker Inc., New York (1983) et dans G. Lopez-Berenstein et I.J. Fidler, Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer, A.R. Liss, Inc., New York (1989); R.R.C. New, Liposomes - a practical approach, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo (1990).

Comme autres références relatives aux liposomes et à leur emploi, on peut citer les suivantes :

I.W. Kellaway et S.J. Fair, Adv. Drug Delivery Reviews 5 (1990) 149, F. Martin, J. Liposome Res. 1 (1990) 407, K. Egbaria et N. Weiner, Adv. Drug Delivery Reviews 5 (1990) 287, A. Klivanov et al., FEBS 268 (1990) 235.

La matière formatrice de liposomes est essentiellement un phospholipide ou un mélange de phospholipides.

La substance active est de préférence intercalée, puis placée dans la bicouche phospholipidique.

Une variante du procédé préférée pour la formation de liposomes comprend les stades suivants :

- a) on forme une solution d'un composé de formule I et d'un lipide dans un solvant organique,
- b) on élimine le solvant de la solution pour obtenir un résidu,
- c) on met en suspension le résidu dans une solution d'un agent tampon,
- d) on soumet la suspension à une agitation et à une homogénéisation jusqu'à ce que l'on produise des liposomes, et
- e) on isole les liposomes.

Dans le stade a), le terme "solution" englobe des "pseudo" solutions telles que des émulsions; cependant, on préfère produire une solution claire et uniforme. Tout système solvant peut être utilisé, capable de dissoudre ou solubiliser le composé de formule I et le lipide. Le système peut être constitué d'un solvant unique ou

d'un mélange de solvants. Il peut contenir jusque, par exemple, 15 % d'eau. Si on le souhaite, un agent tensio-actif peut être présent. Le système solvant peut comprendre n'importe quel solvant organique approprié qui peut être éliminé du lipide par évaporation. On peut utiliser une large variété d'éthers tels que le diéthyl éther et le diisopropyl éther, des esters tels que l'acétate d'éthyle, des alcools tels que le méthanol, l'éthanol et le tert-butanol, et des hydrocarbures halogénés tels que le chlorure de méthylène et le chloroforme. Si on le souhaite, de l'acide acétique peut être présent. On préfère utiliser du chlorure de méthylène, du méthanol ou du tert-butanol.

Dans le stade b), le solvant peut être éliminé par n'importe quel moyen classique. Comme moyens préférés, on peut citer une évaporation sous faible vide, par exemple, 10 à 50 mm Hg (1,33-6,66 kPa); ou un séchage par congélation sous un vide élevé, par exemple, au-dessous de 5 mm Hg (0,666 kPa), par exemple à 0,1 mm Hg (13,3 Pa). On peut également augmenter la surface du lipide sec tout en maintenant le volume à la fois du solvant et du tampon aqueux (stade c) à un faible niveau. Cette augmentation de la surface lipidique peut être obtenue en séchant les lipides sur un support finement divisé (tel que des cristaux de chlorure de sodium, de lactose ou d'autres polysaccharides) ou en séchant les lipides sur des billes de verre (R.C.C. New, Liposomes - a practical approach, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo (1990)). Lorsqu'on utilise le procédé de séchage par congélation, le stade est réalisé de manière appropriée à une température inférieure à la température ambiante et le vide et la température sont contrôlés de telle sorte que le mélange en cours d'évaporation soit environ 1-3°C plus froid que la partie environnante.

Ce contrôle peut être effectué de manière classique. Un programme typique de séchage par congélation commence à environ -60°C et augmente jusqu'à -15°C sur une période de 12 heures. La température augmente ensuite à $+10^{\circ}\text{C}$ et est maintenue pendant deux heures. Une autre façon d'éliminer le solvant dans la production à l'échelle technique de liposomes est le procédé de séchage par pulvérisation tel que décrit par exemple par H. Kikuchi et al., Chem. Pharm. Bull. **35** 1522 (1991). Conformément à ce procédé, les lipides et le médicament sont dissous dans le solvant organique volatil dans lequel une matière de noyau peut être mise en suspension, par exemple, le chlorure de sodium ou le saccharose. La solution ou la suspension obtenue est ensuite séchée par pulvérisation de manière classique, par exemple, dans un Büchi 190 Mini Spay Dryer.

Dans le stade c), l'agent tampon utilisé est de préférence un tampon de phosphate, par exemple de pH 4-8, notamment de pH 5-6,8. De préférence, la phase aqueuse est hypotonique, c'est-à-dire, inférieure à 300 mosmoles/litre. La suspension obtenue contient de préférence environ 0,001 à environ 0,2 g de lipides par ml.

Dans le stade d), on utilisera de préférence un traitement mécanique, par exemple, par tourbillonnement ou à l'aide d'un homogénéiseur tel que le Superdispax (IKA Labor-technik, Staufen, RFA) ou le Microfluidizer (Microfluidics Corp., Newton, Massachusetts, USA). L'homogénéisation peut également être assurée par un rayonnement ultrasonique. Des fréquences appropriées de ce rayonnement peuvent être par exemple de 30 à 80 kHz. Une puissance typique est de 200 à 400 watts pour environ 10 ml de mélange en cours d'homogénéisation ou d'agitation. Naturellement, on préfère que le mélange en cours d'homogénéisation soit séparé de toute trace

de titane ou d'autres métaux associés au générateur de rayonnement ultrasonique afin d'éviter la contamination par le métal. La température est de préférence d'environ 10 à environ 70°C. On préfère la température ambiante pour les lipides insaturés et une température de 60 à 70°C pour les lipides saturés. Si on le souhaite, le rayonnement ultrasonique peut être suivi d'une agitation mécanique à haute vitesse, par exemple, 10.000 à 27.000 tours/min.

Dans le stade e), les liposomes peuvent être isolés selon des techniques classiques, par exemple, par ultra-filtration, centrifugation, échange d'ions ou chromatographie sur gel, dialyse, etc. L'isolement des vésicules n'est pas nécessaire si la substance médicamenteuse est incorporée à un haut degré dans la bicouche de phospholipide. C'est le cas, par exemple, avec des concentrations du composé 1 inférieures à 1 mg/ml. Les liposomes peuvent être filtrés et stérilisés à travers un filtre ayant des ouvertures convenablement petites, par exemple, de 0,1 à 1 micromètre. Si on le souhaite, la filtration peut être réalisée au-dessus du point de transition de phase du lipide, par exemple, de 30 à 70°C. Pour améliorer la stabilité à long terme, les préparations sont soumises à un séchage par congélation.

Dans un autre aspect, la présente invention vise une composition comprenant un composé de formule I en association avec un phospholipide. Ces compositions sont particulièrement utiles pour la formation de liposomes, par exemple, comme décrit dans le stade a) ci-dessus.

Un autre procédé de préparation de liposomes à stade unique préféré pour la préparation à grande échelle de liposomes contenant un composé de formule I est tel que décrit par M. Brandl et al. dans Drug

Development and Industrial Pharmacy 16 (1990) 2167; dans ce procédé, les phospholipides et les médicaments sont dispersés directement dans la phase aqueuse et le tout est suivi par une homogénéisation, par exemple, dans un homogénéiseur approprié, par exemple celui disponible dans le commerce sous la marque déposée Microfluidizer.

Les vésicules formées peuvent être unilamellaires ou multilamellaires. Leur calibre peut varier d'environ 20 nm à environ 10 micromètres en diamètre moyen. Elles ont de préférence moins de 200 nm environ de diamètre. Le composé de formule I fait de préférence partie des lamelles phospholipidiques. Seules des quantités mineures font partie du fluide intraliposomique ou des deux. L'incorporation aux bicouches de phospholipides peut se faire selon une concentration d'au moins 1 mg/ml. Les liposomes comprennent un ou plusieurs lipides, de préférence des phospholipides, par exemple le phosphomnoglycéride, l'acide phosphatidique et le sphingolipide, de préférence la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine, le phosphatidylglycérol, la sphingomyéline, la phosphatidyléthanolamine, la stéarylamine ou l'acide phosphatidique; en particulier la dimyristoylphosphatidylcholine, le dimyristoylphosphatidylglycérol, la distéaroylphosphatidylcholine, le distéaroylphosphatidylglycérol, la phosphatidylcholine, le phosphatidylglycérol et la phosphatidylsérine. Les liposomes peuvent comprendre un stérol tel que le cholestérol.

Par ailleurs, du phosphatidyléthanolaminepolyéthylèneglycol (PE-PEG) peut être incorporé aux liposomes et peut augmenter la demi-vie plasmatique du liposome après application

intra-veineuse, ce qui entraîne une libération progressive du composé de formule I ou une fourniture ciblée du composé de formule I par les liposomes. Dans le cas d'une injection, on préfère utiliser des phospholipides hydrogénés ayant un point de fusion supérieur à 42°C, par exemple, DSPC, DSPG ou HPC.

La concentration totale des phospholipides est d'environ 1 mg/ml à environ 200 mg/ml; on préfère une concentration comprise entre 15 mg/ml et 100 mg/ml. La concentration du composé de formule I est par exemple d'environ 0,1 mg/ml à environ 20 mg/ml; on préfère utiliser une concentration d'environ 0,3 mg/ml à environ 10 mg/ml, en particulier environ 5 mg/ml. Le rapport pondéral du composé de formule I à la totalité des phospholipides est par exemple d'environ 1:1 à environ 1:2000, de préférence 1:10 environ. Les liposomes peuvent être isolés et stérilisés de manière classique.

Comme autres phospholipides synthétiques susceptibles d'être avantageusement utilisés, on peut citer les phospholipides synthétiques tels que le phosphatidyléthanolamine polyéthylène glycol (PE-PEG) qui, en particulier lorsqu'il est introduit dans des liposomes neutres et de petite taille, entraîne une demi-vie accrue du plasma.

Certains liposomes constitués de phospholipides neutres, c'est-à-dire, non chargés, peuvent présenter un certain degré d'instabilité, telle qu'une certaine aggrégation et sédimentation après stockage pendant plusieurs jours. Cela peut être empêché par lyophilisation des liposomes et par leur remise en suspension peu de temps avant leur usage. Il est indiqué de refroidir les liposomes rapidement en dessous de la température eutectique, par exemple à -28°C, de préférence à -40°C, dans un laps de temps de

30 minutes si on utilise du lactose comme cryoprotecteur pour obtenir des produits homogènes. Des cryoprotecteurs indiqués sont, par exemple, le saccharose, le tréhalose, le lactose, le mannitol, le maltose, le fructose, le glucose, le galactose, le mannose, le xylite et le sorbite, de préférence le lactose, le maltose, le saccharose et le tréhalose, en particulier le lactose et le maltose, tout particulièrement le lactose à 9 %. Au cours de la lyophilisation, une diminution de diamètre d'environ 10 à 40 % peut avoir lieu. De manière générale, aucune modification sensible de taille et de contenu ne se produit après la lyophilisation au cours des deux premières semaines de stockage à 5°C. Au bout d'un mois, une réduction de 15 % de la taille des vésicules peut être observée dans certains liposomes. La concentration de cryoprotecteur n'est pas cruciale et se situe dans la plage de 2 % environ à 10 % environ. Le stockage est de préférence effectué à environ 5°C.

L'osmolarité des liposomes après reconstitution convient bien par exemple à une application parentérale et se situe typiquement dans la plage d'environ 250 à environ 500, par exemple de 290 à 350 mosmoles/l.

La reconstitution est effectuée en ajoutant de l'eau pour obtenir le volume original. De préférence, cela se fait peu de temps avant l'emploi. Pour une détermination analytique du composé de formule I et des phospholipides, un échantillon reconstitué aqueux est de préférence dilué à raison de 1:1 avec un alcool tel que du méthanol à 50 %.

La stérilisation peut être réalisée par filtration stérile (taille des pores de 0,2 micromètre) des liposomes avant remplissage aseptique et séchage par congélation. Pour une préparation à grande échelle, on préfère utiliser 1 % d'alcool benzylique à titre de

conservateur au cours du traitement en phase aqueuse. L'alcool benzylique peut être complètement rééliminé au cours du stade de séchage par congélation final.

On constate non sans surprise qu'un composé de formule I, lorsqu'il est incorporé à la membrane lipidique, est habituellement protonaté même lorsque les liposomes sont obtenus à partir de la base libre.

Les exemples suivants illustrent la présente invention (le composé de formule I est dénommé brièvement par la suite composé 1) :

Exemple 1 : Préparation des liposomes

(Composé 1 : petite échelle)

10 mg du composé 1 sous forme de base libre sont solubilisés dans du méthanol et mélangés à des solutions méthanoliques de phosphatidyl-choline de soja (PC) et de dimyristoyl-phosphatidyl-glycérol (DMPG) dans un rapport molaire de 1:4:2, c'est-à-dire un rapport poids/poids de 1:7:3, respectivement. Le mélange est séché dans un flacon à fond rond sous vide en utilisant un évaporateur rotatif pour former un film de lipides/composé 1. Le film séché est hydraté en secouant avec 10 ml d'un tampon de phosphate 20 mM à pH 6,8 contenant 9 % du lactose cryoprotecteur. Les liposomes qui se forment sont des vésicules multi-lamellaires (MLV) ayant des tailles hétérogènes jusqu'à environ 50 μm . La suspension de MLV est homogénéisée par tourbillonnement et calibrée par extrusion en séquence à deux reprises à travers des membranes de polycarbonates à nucléopores de calibre de pores de 1, 0,4 et 0,2 micromètre. Ensuite, la préparation liposomique est lyophilisée et les liposomes isolés sont stockés à 5°C.

Dans des variantes de l'exemple 1, on utilise comme substance cryoprotectrice du maltose, du saccharose ou, respectivement du tréhalose.

Dans une variante, l'homogénéisation des MLV est réalisée par traitement aux ultrasons.

Dans une autre variante encore, l'homogénéisation des MLV est effectuée par traitement avec un homogénéiseur Superdispax (IKA Labortechnik, Staufen, RFA).

Dans une autre variante, l'homogénéisation des MLV est effectuée par traitement avec un homogénéiseur de type Microfluidizer (Microfluidics Corp., Newton, Massachusetts, USA).

Dans d'autres variantes, le PC de soja et le DMPC sont remplacés par les phospholipides suivants :

- dimyristoyl-PC (DMPC);
- dipalmitoyl-PC (DPPC);
- dioléoyl-PC (DOPC);
- dioléoyl-PG (DOPG);
- palmitoyl-oléyl-PC (POPC);
- palmitoyl-oléyl-PG (POPG);
- dioléoyl-phosphatidyl-sérine (DOPS);
- phosphatidyl-sérine (PS) de cerveau bovin; et
- phosphatidyléthanolaminepolyéthylèneglycol (PE-PEG)

Dans une autre variante, on utilise le composé de formule I sous la forme de sel d'addition avec de l'acide chlorhydrique.

TABLEAU 1

Exemples de liposomes de composé 1 :

Lot N°	Composé 1 (mg/ml)	Phospholipides		Rapport (molaire) (Composé/ Phospholipides)	Taille des vésicules* (nm)
		Rapport (p/p)	Concentration (mg/ml)		
1	1 (base)	PC/DMPG 7/3	15	1/6	215
2	1 (sel de HCL)	PC/DMPG 7/3	15	1/6	223
3	0,3-3,0 (base)	PC/DMPG 7/3	15	1/2 - 1/20	
4	1 (base)	POPC/DOPS 7/3	15	1/6	240
5	3 (base)	POPC/DOPS 7/3	30	1/4	171
6	3 (base)	POPC/DOPS 7/3	30	1/4	250
7	3 (base)	POPC/DOPS 7/3	30	1/4	250

* Comme paramètre hydrodynamique

Caractérisation :

a) Capacité d'encapsulation maximum

Les préparations liposomiques sont des suspensions de petites vésicules (taille entre 100-250 nm de diamètre) avec un aspect laiteux, qui sont stables à l'état fluide pendant plusieurs jours.

Pour établir la quantité de composé de formule I qui est encapsulée dans les vésicules, les échantillons sont soumis à une GPC en utilisant soit 10 ml de Sephadex G25 placés dans des colonnes de verre ou des colonnes pd10 préemballées prêtes à l'emploi (Pharmacia) avec 9,1 ml de Sephadex G25. Toutes les colonnes sont lavées avant emploi avec un éluant de trois fois le volume à vide de la colonne.

Des échantillons (1 ml) sont appliqués sur la colonne et la fraction liposomique est éluée avec du chlorure de sodium 0,15 M (0,9 %) dans de l'eau. Après 10 à 15 ml, l'éluant est remplacé par un tampon d'acétate 10 mM de pH 3 pour éluer le composé de formule I non encapsulé dans les vésicules (composé libre 1). Les fractions sont testées pour le composé 1 par analyse HPLC [se référer à i)].

A des concentrations de phospholipides de 15 mg/ml, le composé 1 peut être complètement encapsulé dans les vésicules jusqu'à des concentrations de 1 mg/ml dans un tampon de phosphate à pH 6,8. Cela peut être testé soit par visualisation des cristaux (au microscope) du composé 1 qui sont formés lorsque la substance médicamenteuse est ajoutée en excès, soit par séparation du composé non encapsulé 1 du composé liposomique 1 à l'aide d'une GPC en utilisant du Sephadex G25. La figure 1 présente le profil d'élution d'un mélange de 0,4 mg du composé 1 libre et de 1,0 mg de liposomes de

composé 1. 100 % du composé de formule I appliqués à la colonne sont récupérés. La fraction liposomique est éluée avec du chlorure de sodium à 0,9 % (12 ml), le composé libre 1 est élué avec un tampon d'acétate 10 mM à pH 3,0. La ligne continue représente la quantité de composé 1 en fractions simples tandis que la ligne interrompue présente la quantité cumulée du composé 1 élué.

La capacité d'encapsulation est influencée par les compositions tampons utilisées pour l'hydratation : avec un tampon de phosphate et un tampon HEPES, on peut seulement encapsuler 1 mg/ml. On peut observer que le composé 1 précipite dans une certaine mesure sous l'effet des deux tampons. Lorsqu'on utilise de l'eau déminéralisée, une incorporation jusqu'à 2,5 mg/l peut être obtenue (Tableau 2) : les liposomes de composé 1 ont été préparés comme décrit ci-dessus en utilisant de la phosphatidylcholine de soja et du dimyristoyl-phosphatidyl-glycérol (DMPG) en concentration totale de 15 mg/ml, rapport 7:3. Des échantillons analytiques sont appliqués à une colonne de chromatographie par perméation de gel (GPC) et testés pour la quantité de composé 1 encapsulée dans les liposomes et pour le composé 1 libre :

09200502

TABLEAU 2

Capacité d'incorporation de liposomes pour le composé 1 avec différents tampons

Concentration (mg/ml)	Rapport molaire théorique 1)	Observation de cristaux 2)	Fractions de GPC (%) liposomes libres	Taille des vésicules d(nm) pD 3)	Perte (%) trouvée
Tampon de phosphate (20 mM, pH 6,8) :					
1	0,93	-	0 >91	141	2 5
1,5	1,39	+	<1 >76	149	4 14
2	1,30	+	0 >80	143	2 26
2,5	1,25	+	0 78	196	6 35
3	1,23	+	<1 83	139	2 32
Tampon HEPES (35 mM, pH 6,8) :					
1	0,90	-	0 86	131	3 4
1,5	1,53	(+)	<1 >80	147	3 6
2	1,50	+	14 52	166	4 17
2,5	1,43	+	<1 54	161	2 25
3	2,23	+	>1 >67	147	2 17

Eau :

1	0,99	1:6,5	-	0	82	99	2	5
1,5	1,58	1:4,3	-	0	91	121	2	5
2	1,99	1:3,3	-	0	90	131	2	4
2,5	1,47	1:2,6	-	<1	86	124	3	11
3	2,46	1:2,2	(+)	<1	83	126	3	10

1) Rapport molaire du composé 1 aux phospholipides

2) Observation au microscope (Axioskop, Zeiss)

3) Taille des vésicules : d = diamètre, pD = polydispersion
(1 = monodispersion, 10 = polydispersion)

4) Perte = résidu sur le flacon et les filtres après fabrication

Des préparations liposomiques de concentrations plus élevées du composé 1, c'est-à-dire, 2 et 4 mg/ml, et d'une série de phospholipides (Tableau 3) ont confirmé la limite approximative de 1 mg de composé 1 par ml à des concentrations de phospholipides de 15 mg/ml, c'est-à-dire, un rapport molaire approximatif médicament/lipide de 1:6. L'encapsulation est indépendante des divers phospholipides utilisés :

Tableau 3

Encapsulation du composé 1 à des concentrations de 2 et 4 mg/ml et avec divers phospholipides

Phospholipides	Conc. de composé 1 (mg/ml) trouvée	
	2 mg/ml-théorique	4 mg/ml-théorique
PC	1,0 +/- 0,5	1,2 +/- 0,7
PC/DOPG	1,8 +/- 0,1	2,2 +/- 1,0
PC/DOPS	1,6 +/- 0,2	3,0 +/- 0,6
HPC	2,0 +/- 0,2	3,5 +/- 0,4
HPC/DOPG	1,7 +/- 0,3	2,2 +/- 0,2
HPC/DOPS	2,0 +/- 0,3	3,2 +/- 0,6
POPC	1,8 +/- 0,2	3,4 +/- 0,4
POPC/DOPG	1,9 +/- 0,1	2,5 +/- 0,3
POPC/DOPS	1,4 +/- 0,2	2,8 +/- 0,4
DOPC/DOPG	1,6 +/- 0,3	3,4 +/- 0,4
DMPC	1,8 +/- 0,4	1,5 +/- 1,0
DMPC/DMPG	2,0 +/- 0,3	3,0 +/- 1,2

On a utilisé le tampon de phosphate (20 mM, pH 6,8) pour l'hydratation. La concentration des phospholipides était de 15 mg/ml. Le composé 1 a été déterminé après filtration à travers des membranes de 0,2 micromètre. Trois préparations de chaque concentration ont été examinées (en moyenne $\pm$ SD, n = 3).

b) Rendement de l'encapsulation

Pour des concentrations du composé 1 (sous forme de base libre) jusqu'à 1 mg/ml, le rendement du contenu est supérieur à 90 %. Aux concentrations supérieures, le rendement est réduit en raison de la précipitation du composé 1 en excès (non encapsulé).

c) Rendement

Les rendements se situent dans la plage de 70 à 80 % pour un volume des lots allant jusqu'à 10 ml (10 mg de composé 1). A 100 ml (100 mg de composé 1), les rendements sont de 90 % et à 1 l (1 g de composé 1) supérieurs à 90 %.

d) Impuretés et stabilité

Deux variantes de liposomes lyophilisés de composé 1 (composition : se référer aux lots 1 et 2, tableau 1) ont été placées dans un système d'expérimentation de la stabilité à différentes températures et humidité ambiantes : -25°C, 5°C, 25°C et 30°C à 75 % d'humidité relative. La stérilisation a été obtenue par filtration à travers des membranes de 0,2 micromètre et remplissage aseptique sur un banc stérile. Les résultats sont résumés dans le tableau 4.

- 22 -

Presqu'aucune dégradation du composé 1 n'a été détectée après fabrication. Au bout d'un mois, les taux d'impureté se sont révélés être inférieurs à 2 % même à 30°C.

Les données de stabilité à 3 mois montrent, qu'au bout d'un mois, une augmentation mineure des produits de dégradation se produit en particulier à température élevée. Les taux d'impuretés au bout d'un stockage de trois mois à 5°C étaient inférieurs à 1 %. Le stockage à 5°C est adéquat.

TABLEAU 4

Stabilité des liposomes du composé 1

Conditions de stockage	Charge de composé 1 (%)		Produits de dégradation du composé 1 (%)	
	Lot 2	Lot 1	Lot 2	Lot 1
initiales	100	100	0,2	0,1
- 25°C				
1 mois	95,7	94,9	0,3	0,3
3 mois	95,6	96,8	0,4	0,5
5°C				
1 mois	96,1	95,1	0,9	0,7
3 mois	95,6	96,1	0,9	1,0
25°C				
1 mois	95,7	94,5	1,4	1,5
3 mois	95,2	95,1	2,7	2,9
30°C/75 % H.R.				
1 mois	95,2	94,7	1,5	1,9
3 mois	95,7	94,5	3,1	3,9
H.R. = humidité relative				

e) Solvants résiduaires

La préparation et la lyophilisation de liposomes de composé 1 menaient à des taux de méthanol inférieurs à 0,1 %. Aucune trace de chloroforme n'était détectable (limite = 0,05 %).

f) Taille des vésicules

Les tailles des vésicules des liposomes sont habituellement déterminées par diffusion de la lumière laser et sont exprimées par le diamètre hydrodynamique moyen aussi longtemps que la répartition des tailles des particules est approximativement unimodale. Les diamètres moyens des liposomes de composé 1 sont d'environ 200 à 300 nm après fabrication et filtration à travers des membranes de 0,2 micromètre. La taille des vésicules est inférieure (150-250 nm) après séchage par congélation et redispersion dans de l'eau. Au cours du stockage, les vésicules redeviennent plus petites : une réduction de 10 % au bout de trois mois est observée (Tableau 5) :

Tableau 5

Taille des particules des liposomes de composé 1 après
lyophilisation, stockage et reconstitution

Lot	Rayon hydr.		Diamètre hydr.		Distribution	
	Rh (nm)	PDC %	Dh (nm)	(diam. (nm))	min.	Max.
2 initial	111,5	50	223	147	500	
1 mois, 5°C	96,8	48	194	126	434	
3 mois, 5°C	99,3	49	199	132	454	
1 initial	108	47	216	140	546	
1 mois, 5°C	93,2	48	186	120	468	
3 mois, 5°C	95,3	49	191	124	498	

Dh = Diamètre hydrodynamique
 PDC = Coefficient de polydispersion
 Rh = Rayon hydrodynamique

g) Stabilité physique

11 cryoprotecteurs ont été étudiés pour leur caractère approprié. Les résultats sont résumés dans les tableaux 6.1 et 6.2 :

TABLEAU 6.1Lyophilisation des liposomes de composé 1

Cryoprotecteur	Température eutectique	Apparence
Saccharose	-30	blanc, compact, quelques fissures mineures
Tréhalose	-28	blanc, compact, surface lisse
Lactose	-28	blanc, compact, surface lisse
Mannitol	-30	blanc, compact, détachement de disques individuels
Maltose	-27	blanc, compact, bord brisé
Pas de sucre	-	poreux, fissuré
Fructose	-36	blanc, compact, surface rugueuse
Glucose	-38	blanc, petits pores
Galactose	-36	blanc, petits pores
Mannose	-37	non homogène
Xylite	-38	non homogène
Sorbite	-33	blanc, poreux

TABLEAU 6.2

Taille particulière des liposomes de composé 1 :
effet de la lyophilisation

Cryoprotecteur	Taille particulière (diamètre moyen (nm) +/- SD (n = 3))		Quotient (a/b)
	avant	après	
	lyophilisation	lyophilisation	
	(b)	(a)	
Saccharose	597 (+/- 174)	205 (+/- 29)	0,3 (+/- 0,1)
Tréhalose	407 (+/- 58)	250 (+/- 35)	0,6 (+/- 0,1)
Lactose	381 (+/- 52)	217 (+/- 19)	0,6 (+/- 0,1)
Mannitol	224 (+/- 15)	187 (+/- 12)	0,8 (+/- 0,1)
Maltose	209 (+/- 8)	188 (+/- 16)	0,9 (+/- 0,1)
Pas de suc.	274 (+/- 15)	338 (+/- 31)	1,2 (+/- 0,1)
Glucose	377 (+/- 60)	200 (+/- 32)	0,5 (+/- 0,2)
Galactose	391 (+/- 15)	265 (+/- 60)	0,7 (+/- 0,1)
Fructose	304 (+/- 40)	241 (+/- 30)	0,8 (+/- 0,1)
Mannose	398 (+/- 50)	331 (+/- 30)	0,8 (+/- 0,1)
Xylite	320 (+/- 4)	250 (+/- 16)	0,8 (+/- 0,1)
Sorbite	373 (+/- 57)	139 (+/- 10)	0,4 (+/- 0,1)

Des liposomes de composé 1 ont été préparés avec la concentration suivante :

composé 1 = 1,5 mg/ml
Lécithine de soja = 15 mg/ml
cryoprotecteur = 4 %

h) Spectroscopie IR/ATR

Des essais ex situ ont été réalisés sur des membranes multibicouches avec un rapport du composé 1 aux lipides de 1:2 et sans emploi d'un agent tampon contenant de fortes concentrations d'électrolytes. Dans ces liposomes, le rapport stoéchiométrique du composé 1 aux lipides a été expérimentalement confirmé, c'est-à-dire qu'une répartition homogène de la substance médicamenteuse et des phospholipides est maintenue dans les membranes des bicouches. Une découverte inattendue a été que le composé 1, bien qu'utilisé sous sa forme de base, est protonaté lorsqu'il est incorporé à la membrane lipidique.

Sur base des rapports dichroïques déterminés expérimentalement, l'angle entre l'axe de la molécule du composé 1 et la ligne perpendiculaire au plan de la membrane a été analysé. Avec une haute probabilité, le composé 1 est disposé en parallèle avec les chaînes d'hydrocarbures des lipides et avec un écart de 0-30°C vis-à-vis de la ligne perpendiculaire. Les orientations du composé 1 et du POPC sont illustrées par une modélisation sur ordinateur de la figure 2.

i) Analyse HPLC

La charge médicamenteuse, c'est-à-dire la concentration de composé 1 par ml de liposomes, a été déterminée par HPLC : les colonnes de Spheri-5 RP 18 provenaient de Brownlee Labs; la pompe, le détecteur UV et l'auto-échantillonneur de Kontron. La phase mobile était constituée d'acétonitrile/eau/triéthylamine (800/200/1). On a dû prélever avec soin la préparation d'échantillonnage avant application sur les colonnes : les liposomes neutres (sans charge) sont physiquement

instables. L'agglutination et la sédimentation peuvent être donc empêchées en diluant les échantillons 1:1 avec du méthanol à 50 %.

Exemple 2 : Préparation de liposomes

(Composé 1; température de transition de phase au-dessus de la température ambiante)

Des liposomes ayant une température de transition de phase (T_C) au-dessus de la température ambiante sont préparés comme décrit dans l'exemple 1, mais en utilisant du distéaroyl-PC (DSPC) et du distéaroyl-PG (DSPG) au lieu du PC et du DMPG. Dans une autre variante, le DSPC et le DSPG sont remplacés par de la phosphatidyl choline hydrogénée (HPC). L'hydratation, l'homogénéisation et la filtration sont effectuées à des températures supérieures à T_C . On obtient des résultats comparables à ceux de l'exemple 1.

Exemple 3 : Effets biologiques des liposomes vis-à-vis de la candidose

(Composé 1; in vivo, candidose systémique)

Des liposomes de composé 1 (POPC/PS, 7:3 p/p) ont été examinés dans un modèle murin d'infection fongique profonde contre la candidose systémique : des souris (Balb/C) sont infectées par voie intra-veineuse par la souche *Candida albicans* NRB selon une concentration de 4×10^5 cellules via la veine de la queue. Deux traitements intra-veineux sont administrés aux jours 3 et 4 après l'infection par 0,5 mg de composé liposomique 1 par kg. On observe la survie jusqu'au jour 21. Les comptages de la souche *Candida* sont déterminés dans le foie et les reins.

On a constaté non sans surprise que 10 des 20 animaux survivaient au jour 21. Tous les animaux témoins infectés mais non traités mouraient au jour 8. Ainsi, à la faible dose de 0,5 mg/kg, la survie de 50 % des animaux s'est prolongée de 9 à au moins 21 jours dans le modèle Candida.

Les comptage de la souche Candida ont été déterminés dans le foie et les reins des souris traitées avec le composé liposomique 1 aux jours 5 et 10 après infection.

Le résultat est indiqué dans le tableau 7 ci-dessous:

TABLEAU 7

Comptage de la souche Candida dans le foie et les reins

Jour	Foie	rein
5	160 +/- 74	302 +/- 68
10	62 +/- 32	126 +/- 93

Une réduction marquée au jour 10 est observée.

Un autre test est tel que décrit ci-dessus, mais on utilise la souche Candida selon une concentration de 5×10^5 cellules. Les liposomes sont administrés aux jours 1, 3 et 5.

Exemple 4 : Préparation des liposomes

(Composé 1 : à grande échelle)

Des liposomes ayant la même composition que celle mentionnée dans les exemples 1 et 2 ci-dessus sont

préparés avec le procédé de préparation à étape unique de M. Brandl et al. (Drug Dev. and Ind. Pharm. 16 (1990) 2167) en utilisant un système d'homogénéisation Superdispax, opération suivie par un traitement dans un Microfluidizer. Selon ce procédé, 1 l d'un tampon de phosphate 20 mM, à pH 6,5, contenant 4,5 % de lactose est homogénéisé dans un homogénéiseur Superdispax. 35 g de PC, 15 g de DMPG et 5 g de composé 1 sont dispersés dans la solution au taux de dispersion maximum (15.000 tours/min.) jusqu'à ce que, au bout de 0,5 heure, une taille particulaire moyenne de 200 nm soit obtenue. Ensuite, les liposomes sont transférés dans un Microfluidizer et encore homogénéisés. Cette procédure réduit la taille particulaire des liposomes à 90 +/- 10 nm.

Lorsqu'on utilise du HPC et du DSPG au lieu de PC et DMPG dans l'exemple ci-dessus et que la température du procédé est élevée à 70°C, on obtient des liposomes ayant une taille particulaire moyenne de 135 nm.

Exemple 5 : Préparation d'un gel liposomique

(Composé 1)

2 g de composé 1 (sous forme de base libre) sont solubilisés conjointement avec 20 g de phosphatidyl choline de soja (PC), 4 g de cholestérol et 0,2 g d'alpha-tocophérol dans 10 g de propylène glycol à 50°C (solution organique A). On a laissé la solution organique A refroidir à 25°C. 62 g d'un tampon de phosphate isotonique 20 mM en solution à pH de 6,5 sont agités dans un homogénéiseur Superdispax et 0,2 mg de p-hydroxybenzoate de méthyle, 0,02 g de p-hydroxybenzoate de propyle et 0,15 g de Na-EDTA sont solubilisés dans cet homogénéiseur (solution aqueuse B). La solution aqueuse

B est mélangée à une vitesse de 3.000 tours/min. Ensuite, la solution organique A est introduite dans la solution aqueuse agitée à raison de 1,0 ml à la minute. Des liposomes ayant une taille particulière inférieure à 1000 nm sont formés. A vitesse réduite, on ajoute 0,5 g d'hydroxy propyl méthyl cellulose à la suspension liposomique pour former un gel. On peut remplir des tubes de ce gel.

Exemple 6 : Application pulmonaire avec nébulisateur

(Composé 1)

L'essai est réalisé en utilisant un dispositif Twin Impinger comme décrit dans Hallworth et al., J. Pharm. Pharma 39 966-972 (1987) comme Twin Impinger Type 11 et avec la dénomination de "Glass Impinger" dans la British Pharmacopoeia 1988, 11, Appendix XVII C (A204-A207). Une suspension liposomique contenant le composé 1 sous forme de base avec une composition phospholipidique PC (10,5 mg/ml) et DMPG (4,5 mg/ml) et une suspension liposomique contenant le composé 1 sous forme de base avec une composition phospholipidique H (hydrogénée) (HPC) (10,5 mg/ml de PBSL) et DSPG (4,5 mg/ml PBSL), toutes deux avec une taille particulière moyenne comprise entre 100 nm et 200 nm, sont nébulisées et sont acheminées dans le Twin Impinger avec un débit d'air de 60 l/min. pendant 30 minutes. Les quantités récupérées de chaque partie du Twin Impinger sont mesurées par spectrophotométrie. Les résultats montrent qu'il n'y pas de différence notable entre les répartitions des suspensions liposomiques liées à une composition phospholipidique différente (et à une température de transition différente). Dans les deux cas, on récupère plus de 50 % de la chambre d'impact inférieure, ce qui correspond à une fourniture élevée aux

alvéoles (se référer à la figure 3).

Influence de la nébulisation sur la taille particulaire :

Pour étudier les effets de la nébulisation sur la taille des liposomes avec des compositions phospholipidiques différentes et des températures de transition différentes, les suspensions sont nébulisées en utilisant un "Pari Inhalation Standard Gerät". Les compositions liposomiques décrites ci-dessus sont utilisées, cependant, avec une taille particulaire moyenne supérieure à 500 nm. Des échantillons sont prélevés à divers moments dans le réceptacle du nébuliseur et sont mesurés en utilisant une diffusion de la lumière laser. Il apparaît que la taille des liposomes diminue dans les deux cas rapidement en un laps de temps de 10 minutes et atteint une taille d'environ 150 nm à 200 nm au bout de 12 minutes (figure 4).

Ensuite, la taille moyenne des liposomes qui quittent le nébulisateur est mesurée en utilisant la diffusion de la lumière laser. Il semble que tous les liposomes qui quittent le nébulisateur ont une taille moyenne comprise environ entre 90 nm et 140 nm.

On peut conclure que les liposomes des deux compositions qui sont aérosolisés sont petits et que la taille particulaire n'a pas un rapport direct avec la taille particulaire des liposomes qui sont introduits dans le réceptacle du nébulisateur. Non sans surprise, on constate que la taille des MLV à l'état de gel (HPC/DSPC) est réduite aussi rapidement que la taille des MLV (PC/DMPC) à l'état liquide, bien que la nébulisation ait lieu à température ambiante, bien en dessous de la température de transition de phase de gel à la phase liquide des liposomes à l'état de gel.

Exemple 7 : Effets biologiques des liposomes
vis-à-vis de l'Aspergillose :

L'efficacité biologique des deux variantes de liposomes obtenues dans l'exemple 4, comme décrit ci-dessus, est examinée dans un modèle murin d'infection fongique pulmonaire contre l'Aspergillose avec immuno-suppression induite par la cortisone : des souris femelles ICR de 20 g $\pm$ sont traitées pendant 3 jours avec 2,5 mg d'acétate de cortisone par voie sous-cutanée en commençant un jour avant la contamination pour produire une immuno-suppression. Les souris sont contaminées par voie intra-nasale avec $1,25 \times 10^6$ spores d'*Aspergillus fumigatus*-ATCC 13073 en suspension dans 60 microlitres de solution saline avec du Tween 80 tout en procédant à une légère anesthésie par du pentobarbital. Le traitement aux liposomes est commencé 5 jours avant la contamination et continué chaque autre jour pendant 11 traitements. Une chimiothérapie est appliquée en utilisant l'exposition uniquement du nez aux liposomes nébulisés pendant 30 minutes par jour. Chaque groupe expérimental était constitué de 15 animaux comprenant des animaux non contaminés/non traités, contaminés/non traités et contaminés/traités au placebo. L'évaluation du test est réalisée 20 jours après la contamination en déterminant les taux de survivants et le poids de corps des animaux testés.

Des dosages des liposomes du composé de formule I appliqués quotidiennement, par exemple, de 0,01 à 1 mg/kg prolongent la survie des souris traitées, ou l'on peut observer une amélioration de l'état d'infection de l'Aspergillose.

Ce procédé d'essai est basé sur un modèle murin d'Aspergillose pulmonaire comme décrit par S. Allen et al. au 9ième International Symposium on Future Trends in

Chemotherapy, Genève, Suisse (1990), dans "Aerosol Amphotericine B Chemotherapy in an Immune Compromised Murine Model".

Les préparations liposomiques contenant les liposomes selon l'invention présentent une activité pharmacologique et sont donc utiles comme produits pharmaceutiques.

En particulier, ils sont indiqués pour le traitement des infections fongiques systémiques. Cette activité apparaît, par exemple, chez des souris infectées de manière systémique par la souche Candida après administration des liposomes de l'invention selon un dosage d'environ 0,1 mg/kg à environ 2 mg/kg de composé liposomique de formule 1, par exemple, comme décrit dans l'exemple 3.

Pour l'indication précitée, le dosage approprié variera naturellement en fonction, par exemple, de la forme du composé utilisé, de l'hôte, du mode d'administration et de la nature et de la gravité de l'état à traiter. Cependant, en général, on indique des résultats satisfaisants chez les animaux avec des dosages quotidiens d'environ 1 microgramme/kg à environ 10 mg/kg, spécialement 0,05 mg/kg à 1 mg/kg ou par exemple 0,1 à 1 mg/kg de poids des animaux de composé de formule I sous forme liposomique. Chez les humains, un dosage quotidien indiqué se situe entre environ 0,1 mg et environ 500 mg d'un composé de formule I sous forme liposomique, administré convenablement, par exemple, en dose divisée jusqu'à 4 fois par jour. De préférence, le dosage quotidien est d'environ 5 mg à environ 50 mg du composé de formule I par jour.

Par ailleurs, en particulier, les préparations liposomiques sont indiquées pour le traitement d'infections fongiques pulmonaires. Cette activité apparaît, par exemple, chez des souris dont les voies

pulmonaires sont infectées par l'*Aspergillus* après administration des liposomes de l'invention en leur faisant inhaler une préparation liposomique nébulisée pendant 30 minutes par jour, par exemple comme décrit dans l'exemple 7.

Pour l'indication précitée, le dosage approprié variera naturellement selon, par exemple, l'hôte, la nature et la gravité de l'état à traiter. Cependant, en général, on indique des résultats satisfaisants chez les animaux avec des traitements quotidiens avec la forme liposomique nébulisée du composé de formule 1 par des doses inhalées d'environ 0,1 mg/kg à environ 10 mg/kg de poids des animaux. Chez les humains, un dosage quotidien indiqué se situe entre environ 10 mg et environ 1000 mg/jour, convenablement administrés, par exemple, sous forme de doses divisées jusqu'à 4 fois par jour. Les dosages quotidiens préférés se situent d'environ 20 mg à environ 400 mg, par exemple, d'environ 100 mg à environ 200 mg/jour.

Par ailleurs, en particulier, les préparations liposomiques sont indiquées pour le traitement topique d'infections fongiques de la peau. Les formes d'application les plus appropriées sont les gels, les crèmes et les lotions contenant les préparations liposomiques du composé de formule I, par exemple, le gel liposomique préparé selon l'exemple 5, par exemple, pour les mêmes indications que celles qui sont connues pour les autres compositions topiques, par exemple, les infections fongiques et, dans les mêmes dosages, par exemple, comme confirmé par des essais cliniques standards. Des dosages efficaces typiques sont obtenus lorsque la concentration de l'agent actif dans le tissu de la peau traitée se situe entre 10 et 10.000 ng/cm². Des concentrations tissulaires préférées dans la peau sont comprises entre 500 et 2.000 ng/cm², par exemple 1000 ng/cm², par exemple comme indiqué

par les tests pharmacologiques standards. Cependant, des dosages plus élevés et moins élevés peuvent être efficaces et peuvent être déterminés par des tests standards. Par exemple, des concentrations efficaces sur la peau traitée peuvent être obtenues lorsqu'on applique, par exemple, le composé de formule I sous forme, par exemple, d'un gel liposomique à 2 % selon l'invention sur la zone infectée, par exemple, 5 mg d'agent actif/jour sur une surface de peau d'environ 100 cm².

L'administration peut se faire par voie perorale, topique ou parentérale. Elle sera de préférence topique ou parentérale, en particulier parentérale, tout particulièrement pulmonaire.

L'administration parentérale se présente de préférence sous la forme d'une suspension dans une solution pharmaceutiquement acceptable telle qu'une solution aqueuse isotonique stérile. Ces solutions peuvent être obtenues complètement préparées ou peuvent être préparées à partir de composants pré-formés.

L'administration perorale implique de préférence des liposomes encapsulés, les liposomes étant protégés de la plupart des sucs gastriques et intestinaux avant libération par les liposomes.

L'administration topique est effectuée avec des préparations liposomiques, telles que des lotions, des gels, des crèmes ou des onguents. Une administration locale peut également être effectuée par inhalation, en particulier dans le poumon, par exemple, en utilisant un nébulisateur ou un dispositif de pulvérisation approprié. La nébulisation des suspensions liposomiques peut être réalisée avec un nébulisateur standard actionné par air comprimé ou par ultrasons, bien que d'autres procédés de nébulisation puissent être utilisés, par exemple, des aérosols à doses pressurisés ou des formulations de poudre sèche par des dispositifs

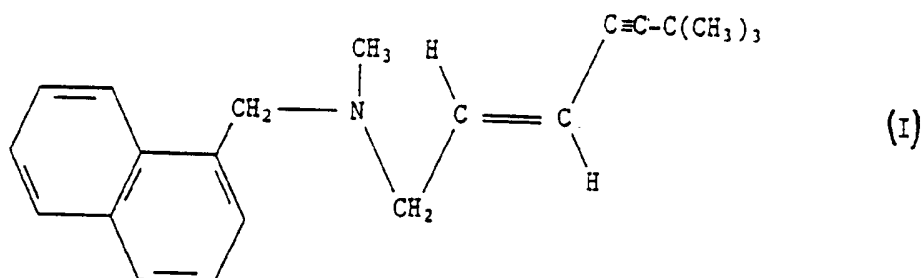
appropriés. La suspension liposomique peut également être séchée par lyophilisation ou par séchage par pulvérisation et la poudre obtenue peut être mise en suspension dans un propulseur approprié tel que du fluorochlorohydrocarbure ou inhalée à l'aide d'un dispositif inhalateur de poudre. Si le composé de formule I est encapsulé dans des liposomes, une action localisée peut être obtenue sur le tractus respiratoire en évitant des réactions systémiques défavorables ..

Ces préparations peuvent être fabriquées de manière classique. Les formes de dosage unitaires contiennent, par exemple, environ 0,025 mg à environ 250 mg d'un composé de formule I sous forme liposomique.

La présente invention vise également un procédé de traitement des infections fongiques systémiques consistant à administrer une quantité pharmaceutiquement efficace d'un liposome comprenant à titre d'agent actif un composé de formule I tel que défini ci-dessus à un sujet qui a besoin d'un tel traitement.

RE V E N D I C A T I O N S

1. Liposomes comprenant le composé de formule I :



2. Préparation liposomique contenant des liposomes selon la revendication 1.
3. Composition comprenant un composé de formule I telle que défini dans la revendication 1 en association avec un phospholipide.
4. Composition selon la revendication 1, 2 ou 3 contenant des phospholipides selon une concentration d'environ 1 mg/ml à environ 200 mg/ml.
5. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes contenant le composé de formule I selon une concentration d'environ 0,1 mg/ml à environ 10 mg/ml.
6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 contenant des composants phospholipidiques qui sont constitués de POPC ou d'un mélange de POPC et de POPG ou de DOPG ou de DOPS.
7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 contenant des composants phospholipidiques qui sont constitués de DMPC ou d'un mélange de DMPC et de DMPG.
8. Préparation liposomique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 contenant des composants phospholipidiques qui sont des phospholipides hydrogénés ayant un point de fusion supérieur à $+42^\circ\text{C}$.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, ayant un rapport poids/poids de phospholipides neutres et chargés négativement d'environ 7:3.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le rapport poids/poids de la substance active aux phospholipides neutres aux phospholipides chargés négativement est d'environ 1/10,5/4,5.

11. Préparation liposomique comprenant un composé de formule I telle que définie dans la revendication 1 sous forme de base libre ou sous forme d'un sel d'addition avec un acide.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes qui se présente sous forme lyophilisée.

13. Procédé de fabrication d'une composition selon la revendication 1, comprenant le mélange d'un composé de formule I tel que défini dans la formule de la revendication 1 avec une matière formatrice de liposomes appropriée.

14. Composition pharmaceutique comprenant une préparation liposomique ayant à titre d'agent actif un composé de formule I tel que défini dans la revendication 1 sous forme de base libre ou sous forme de sel d'addition avec un acide pharmaceutiquement acceptable en association avec au moins un véhicule ou un diluant pharmaceutiquement acceptable.

15. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant du PE-PEG.

16. Procédé de traitement d'infections fongiques systémiques comprenant l'administration d'une quantité pharmaceutiquement efficace d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 à un sujet qui a besoin d'un tel traitement.

17. Procédé de traitement d'infections fongiques pulmonaires comprenant l'administration d'une quantité pharmaceutiquement efficace d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 à un sujet qui a besoin d'un tel traitement.

- 1 -
Figure 1

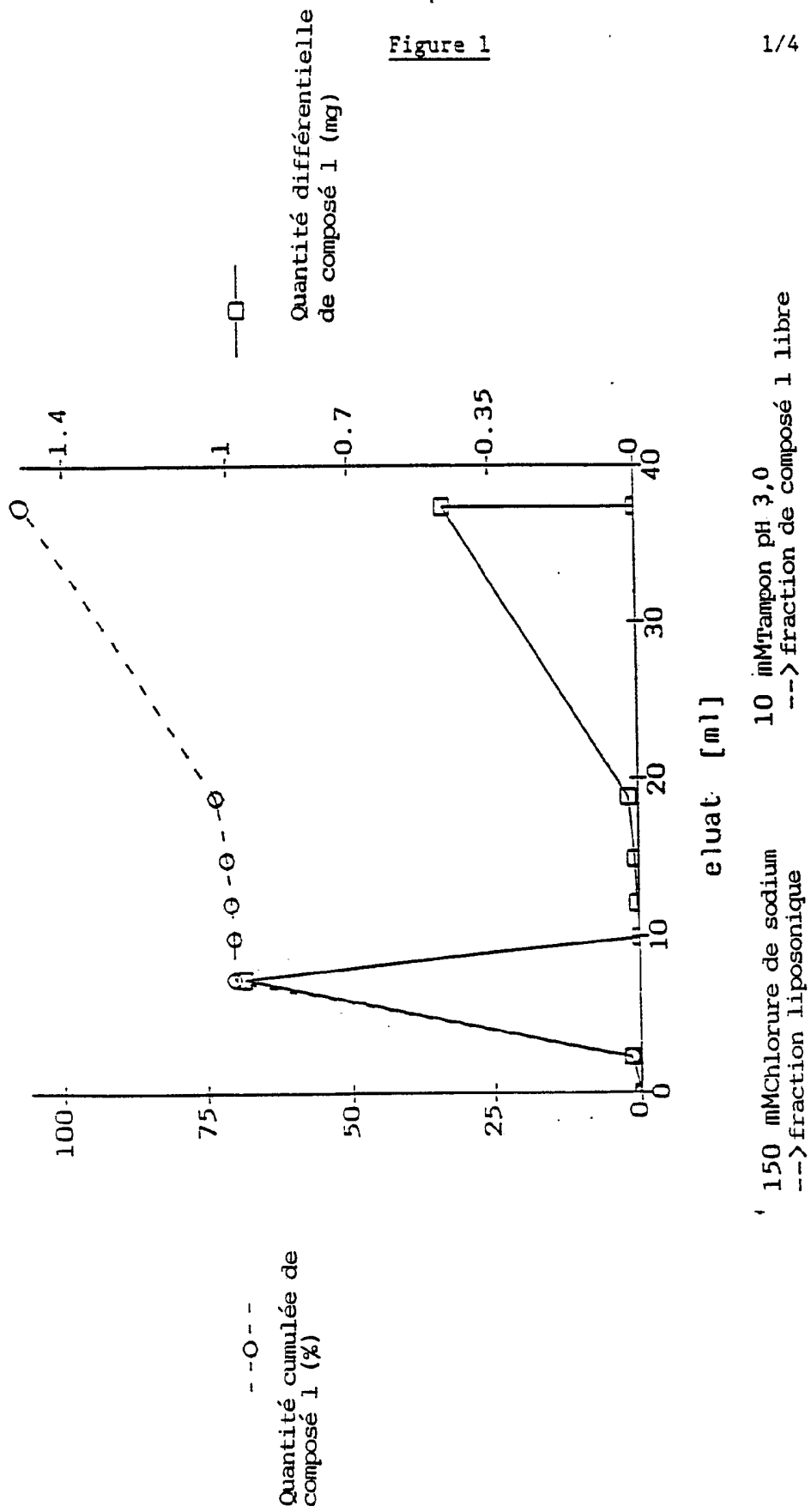
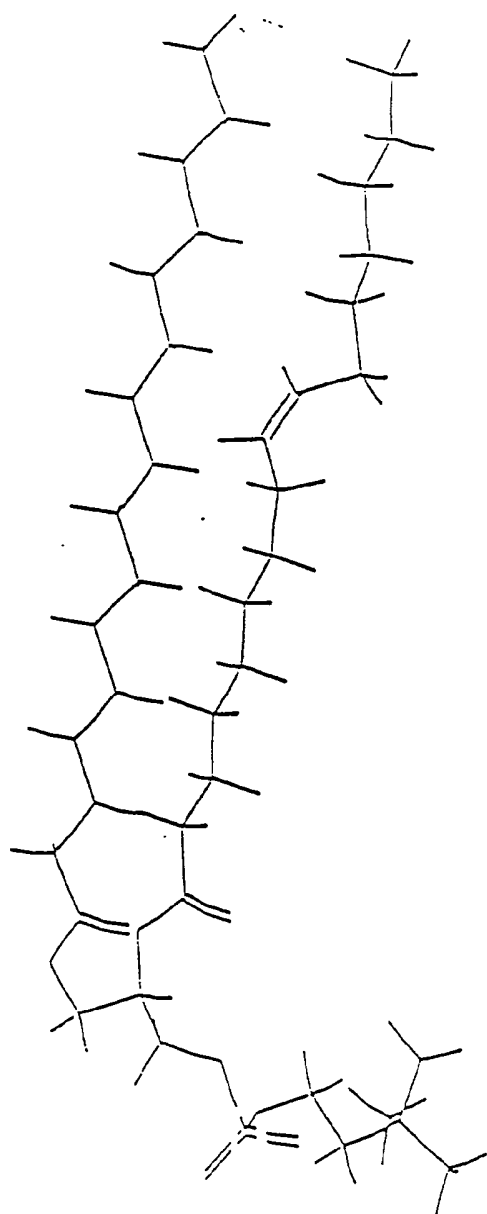
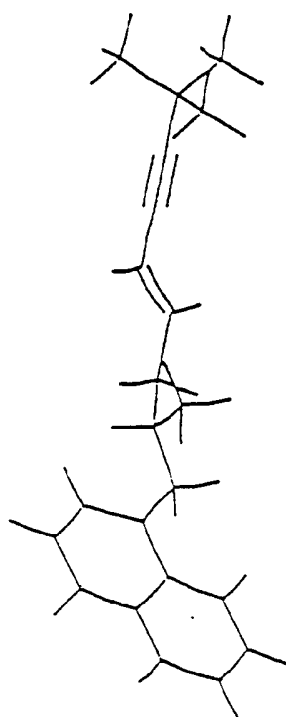


Figure 2

2/4



POPC



Composé 1

Figure 3

3/4

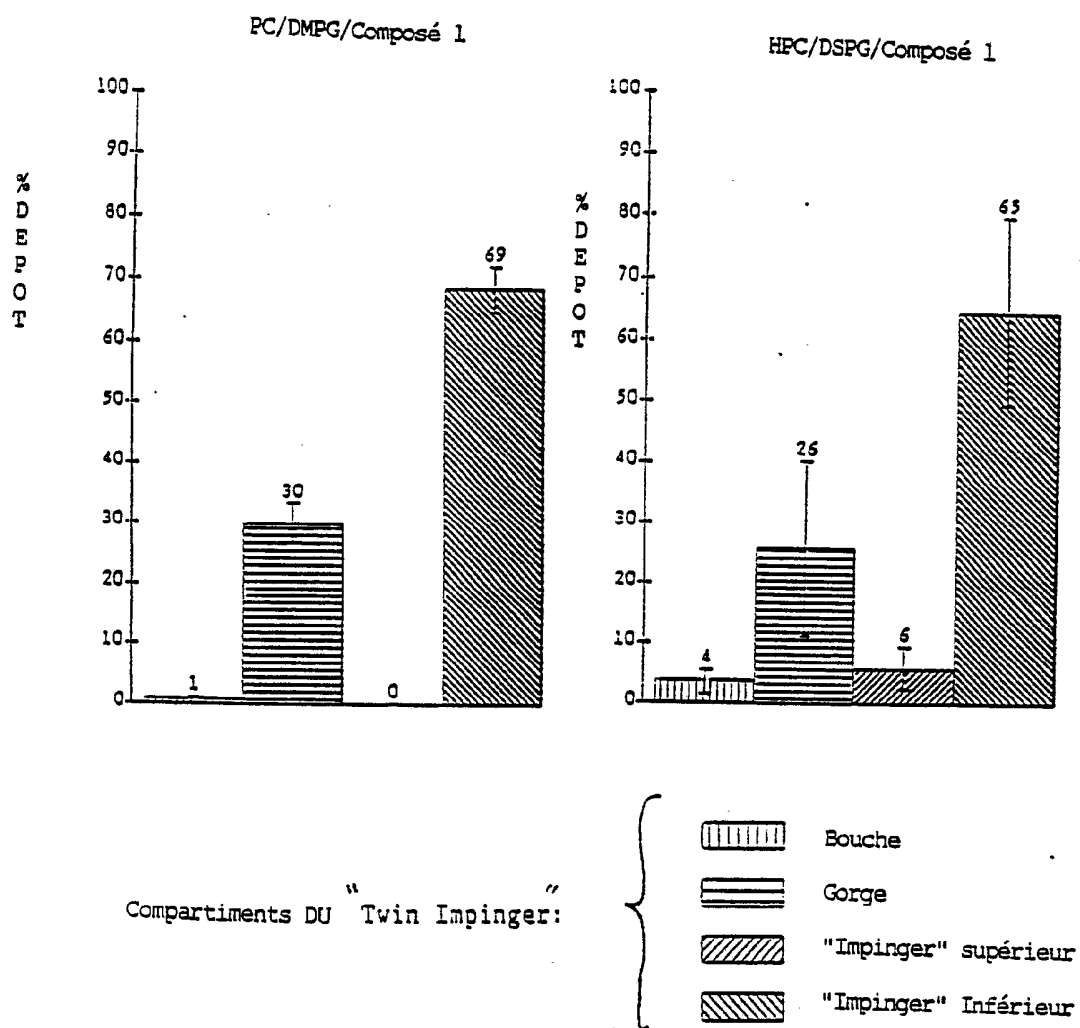
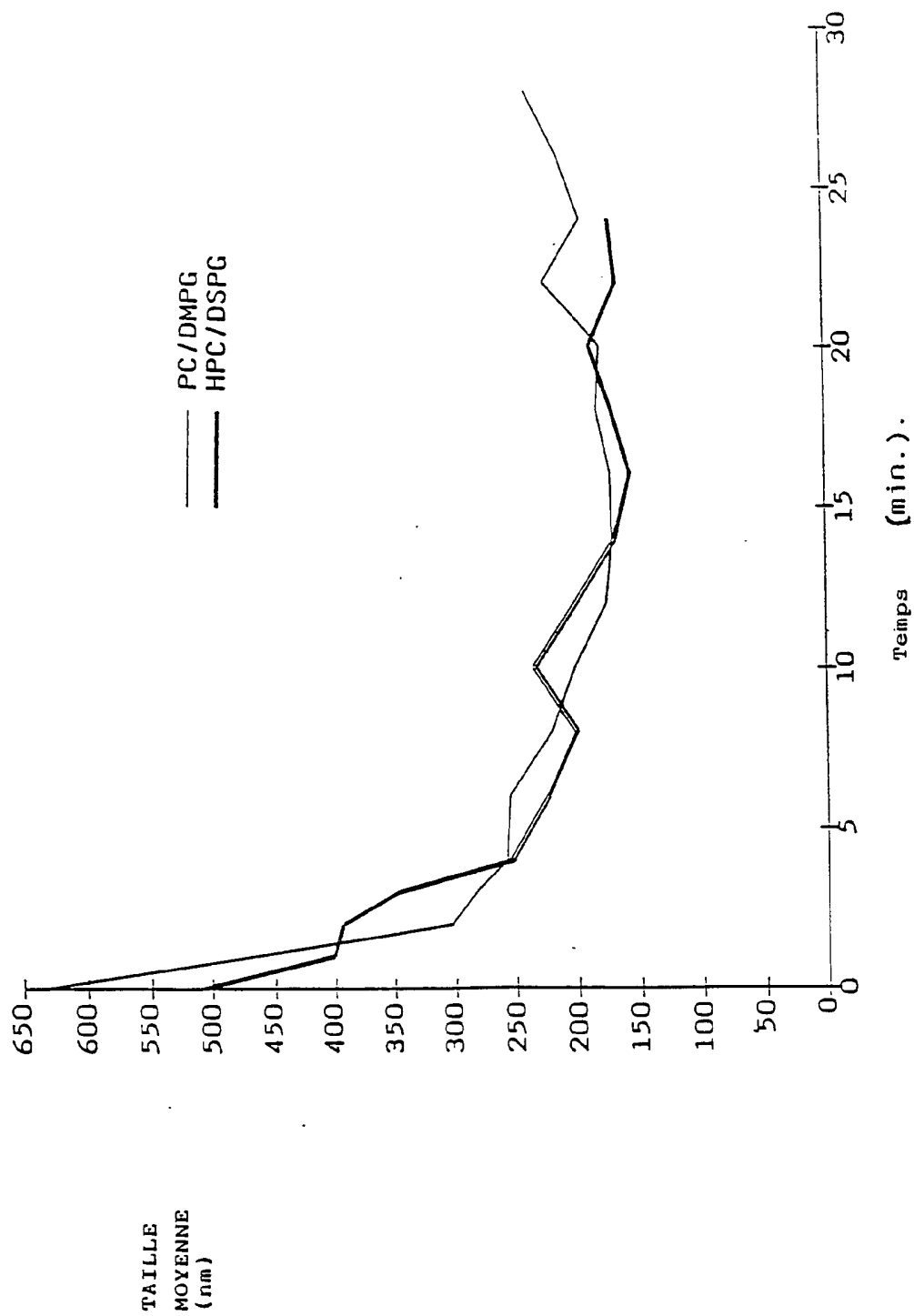


Figure 4

4/4





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 9200502
BO 3973

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
Y	FR-A-2 502 951 (SANDOZ SA) * page 12, ligne 3 - ligne 15 * ---	1-17	A61K9/127 A61K31/135
Y	WO-A-8 702 219 (THE LIPOSOME COMPANY, INC.) * revendications 1-27 * * page 16, ligne 5 * ---	1-17	
Y	WO-A-8 705 803 (AKTIEBOLAGET DRACO) * le document en entier * ---	1-17	
A	WO-A-8 903 677 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) -----		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur	
08 AVRIL 1993		BENZ K.F.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 9200502
BO 3973

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

08/04/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2502951	08-10-82	CH-A- 653256	31-12-85
		CH-A- 647149	15-01-85
		AU-A- 6508486	12-03-87
		AU-B- 564570	20-08-87
		AU-A- 8233482	14-10-82
		BE-A- 892709	30-09-82
		CA-A- 1192496	27-08-85
		DE-A- 3212053	21-10-82
		FR-A- 2572933	16-05-86
		GB-A, B 2098865	01-12-82
		GB-A, B 2148711	05-06-85
		JP-A- 57181007	08-11-82
		NL-A- 8201413	01-11-82
		SE-A- 8202172	07-10-82
WO-A-8702219	23-04-87	US-A- 4861580	29-08-89
		AU-A- 6543786	05-05-87
		EP-A- 0243446	04-11-87
		EP-A- 0460720	11-12-91
		JP-T- 63501569	16-06-88
		US-A- 5041278	20-08-91
WO-A-8705803	08-10-87	AU-A- 7207687	20-10-87
		EP-A- 0298984	18-01-89
		JP-T- 63502899	27-10-88
WO-A-8903677	05-05-89	US-A- 4981690	01-01-91
		AU-B- 615704	10-10-91
		AU-A- 2802089	23-05-89
		EP-A- 0386138	12-09-90
		JP-T- 3501724	18-04-91