



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Int. Cl.³: A 61 K 9/66
B 01 J 13/02



Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

FASCICULE DU BREVET A5

11

624 011

21 Numéro de la demande: 9616/77

73 Titulaire(s):
Battelle Memorial Institute, Carouge GE

22 Date de dépôt: 05.08.1977

72 Inventeur(s):
Michel Schneider, Grand-Lancy

24 Brevet délivré le: 15.07.1981

45 Fascicule du brevet
publié le: 15.07.1981

74 Mandataire:
Blasco Dousse, Carouge GE

54 Procédé de préparation de liposomes en solution aqueuse.

57 Ce procédé comprend les étapes suivantes:

a) On disperse, par vibrations, une solution aqueuse à encapsuler dans un solvant, insoluble dans l'eau, contenant un excès de lipides.

b) On émulsionne cette dispersion dans une phase aqueuse.

c) On soumet cette émulsion à une évaporation de manière que le solvant soit éliminé et que se forme la solution de liposomes dans la phase aqueuse.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation de solution aqueuse de liposomes dans lequel on disperse, par l'effet de vibrations soniques ou ultrasoniques, une solution aqueuse d'un produit à encapsuler dans un solvant peu soluble ou insoluble dans l'eau contenant, dissous, un excès d'un lipide de formule schématique XY où X est une fonction hydrophile lipophile et Y une fonction lipophile hydrophobe, de manière que se forme une solution ou dispersion, dans ledit solvant, de vésicules du liquide à encapsuler appelées précurseurs de liposomes dont la paroi consiste en une pellicule de surfactif dont la fonction X est dirigée vers l'intérieur et la fonction Y vers l'extérieur, puis on met cette solution de précurseurs de liposomes contenant un excès de lipide en présence d'une phase aqueuse de manière qu'on obtienne, dans celle-ci, une solution de liposomes, caractérisé par le fait qu'on émulsionne ensemble les deux phases et qu'on soumet l'émulsion à une évaporation de manière que, par évaporation du solvant, il se forme une solution de liposomes dans ladite phase aqueuse.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit lipide est l'un des composés suivants: la lécithine, la phosphatidyléthanolamine, la lysolécithine, la lysophosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol, la sphingomyéline, la cardioline, l'acide phosphatidique, les cérébrosides, la stéarylamine et la dipalmitoylphosphatidylcholine.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme composé de formule X-Y, un mélange d'au moins un phospholipide et d'au moins un autre lipide appartenant à une catégorie différente de celle des phospholipides et choisi notamment parmi les composés suivants: le cholestérol et le tocophérol.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ledit solvant est choisi parmi le benzène, les dérivés halogénés ou alcoylés du benzène, les étheroxydes aliphatiques, les cétones aliphatiques, les aldéhydes aliphatiques, les esters aliphatiques, les hydrocarbures aliphatiques et les hydrocarbures cycloaliphatiques.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le produit à encapsuler est choisi parmi les colorants, les arômes, les parfums, les médicaments, les enzymes, les polypeptides, les chélatants et les produits industriels dont la mise en œuvre, à partir du moment de leur addition, doit se faire avec un certain retard ou, au cours du temps, progressivement.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la seconde phase aqueuse est de l'eau ou une solution aqueuse de sels minéraux, notamment de NaCl dont la concentration est de 0,15 mol/ClNa/l.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'évaporation résulte de l'application d'un courant de gaz à la surface du liquide ou d'une réduction de la pression agissant sur celui-ci.

La présente invention concerne un procédé de préparation de liposomes en solution aqueuse.

Les liposomes sont des vésicules microscopiques, de forme généralement sphérique, formées d'une ou plusieurs couches (lamelles) concentriques de molécules lipidiques, c'est-à-dire comportant une partie hydrophile lipophile et une autre partie lipophile et hydrophobe. Les lamelles d'un liposome soluble dans l'eau sont constituées d'au moins une couche bimoléculaire du lipide (qu'on pourra désigner ci-après par la formule XY, X étant la partie hydrophile et Y la partie hydrophobe), les molécules de ce dernier étant orientées de manière que ses fonctions hydrophiles soient en contact avec la phase aqueuse. Les lamelles des

liposomes étant séparées les unes des autres par un film d'eau, elles présentent une structure qui peut être représentée schématiquement, en coupe, par une succession d'associations moléculaires XY-YX juxtaposées dans le plan du papier. La taille des liposomes est très variable et dépend, comme on le verra plus loin, de la méthode utilisée pour leur fabrication; en général, leur diamètre se situe entre 25 et 30000 nm, la pellicule lipidique des lamelles ayant une épaisseur de l'ordre de 3 à 10 nm. Les liposomes d'une taille située à la partie inférieure de la gamme présentent, généralement, une enveloppe monolamellaire, c'est-à-dire une couche unique d'agrégats moléculaires XY-YX.

La phase aqueuse dans laquelle les liposomes sont en solution est généralement différente de celle contenue dans ceux-ci. En effet, la préparation de liposomes constitue un moyen d'encapsulation très pratique et très efficace pour un liquide aqueux et elle est particulièrement utile en vue de l'administration dans l'organisme d'êtres vivants de substances biologiquement actives, notamment de médicaments, en évitant la destruction de ces substances dans l'organisme (par exemple sous l'effet des sucs gastriques ou intestinaux) avant que ces substances n'atteignent l'organe où elles doivent agir. Grâce au choix du composé de formule X-Y utilisé pour former la paroi des liposomes, il est, en effet, possible de former des liposomes dont les parois résistent à l'action de certains milieux de l'organisme et ne sont attaqués qu'en présence de milieux qui n'existent que dans les organes où la substance biologiquement active doit être libérée. En conséquence, en général, les liposomes contiendront, à l'intérieur de leur enveloppe, une solution aqueuse du produit encapsulé et, pour constituer la solution elle-même, ils seront dissous ou colloïdalement dispersés dans de l'eau ou dans une phase aqueuse quelconque, par exemple une solution isotonique de NaCl.

On tiendra compte dans la présente description du fait que le contenu des liposomes n'est nullement limité aux médicaments, drogues, substances biologiquement actives, etc., mais qu'il peut être quelconque pour autant que la substance qu'ils renferment soit hydrosoluble. Comme exemples de telles substances, on pourra citer des colorants, des parfums, des arômes et des produits industriels devant, pour une raison déterminée, être ajoutés à une composition ou dans un procédé de traitement à un moment donné mais ne devant devenir actifs qu'avec un certain retard ou, au cours du temps, progressivement. Il serait donc faux d'assimiler les liposomes à des médicaments dont ils ne sont, dans les cas où ils les contiennent, que les véhicules de transport.

On notera aussi que le terme lipide utilisé ici est pris dans son sens le plus large, c'est-à-dire qu'il comprend la plupart des composés répondant à la définition XY donnée plus haut, qu'ils soient naturels ou synthétiques tels que, par exemple, les surfactifs employés dans l'industrie des cosmétiques, des textiles, des détergents, des produits alimentaires, etc.

Il existe plusieurs procédés pour la préparation de solutions de liposomes, telles que définies ci-dessus, lesquels sont décrits dans l'article suivant: «New Aspects of Liposomes», D.A. Tyrrell, T.D. Heath, C.M. Colley & B.E. Ryman, «Biochimica & Biophysica Acta», 457 (1976), 259-302.

L'un de ces procédés consiste à mettre un lipide en présence du liquide aqueux que l'on désire encapsuler et à chauffer le mélange hétérogène ainsi obtenu, à température légèrement supérieure à la température ambiante, puis à le soumettre à une agitation énergétique suivie de l'action d'une vibration de fréquence sonique ou ultrasonique.

L'autre procédé consiste à dissoudre un composé de formule X-Y (X et Y ayant la signification indiquée plus haut), par exemple un lipide, dans un solvant volatil, à former un film de ce composé sur les parois d'un récipient, en évaporant ce solvant de la solution ainsi obtenue, à introduire, dans ce même récipient, le liquide que l'on désire encapsuler dans les liposomes et finalement à soumettre le liquide, dans ce récipient, à l'action d'une vibration de fréquence sonique ou ultrasonique. Plus le traitement de vibra-

tion est énergique et prolongé, plus les liposomes tendent à se transformer en vésicules monolamellaires. On aboutit donc, dans les deux cas, à une solution de liposomes dans le liquide à encapsuler lui-même, ce qui, en général, n'est pas le but recherché. Il s'agit donc, alors, de séparer les vésicules du liquide porteur et de les redisperser dans une phase aqueuse différente. Une telle séparation d'avec le liquide porteur peut être effectuée par chromatographie sur tamis moléculaires, sur gels de silice ou de polymères ou par centrifugations répétées, méthodes qui sont longues et peu économiques.

On peut aussi, selon un autre procédé de préparation de solutions de liposomes, injecter dans la solution à encapsuler une solution de lipide dans l'éthanol, ce qui engendre la formation de liposomes d'environ 25 nm de diamètre. Cette méthode présuppose cependant que la substance à encapsuler n'est pas dénaturable par l'alcool et, d'autre part, que la séparation des vésicules et leur redissolution dans la seconde phase aqueuse se heurte aux mêmes inconvénients que décrits ci-dessus.

On a également utilisé une méthode consistant à mélanger à la solution à encapsuler un lipide et un détergent, puis, après émulsion, à éliminer le détergent par dialyse. Là, de nouveau, on obtient une solution de liposomes dans le liquide à encapsuler qu'il s'agit, ensuite, de purifier.

On remarquera encore que les procédés ci-dessus nécessitent de disposer d'un volume total du liquide que l'on désire encapsuler beaucoup plus grand que le volume de ce liquide qui est finalement contenu dans les liposomes obtenus. En effet, selon ces procédés, les liposomes se forment à l'état de solution ou dispersion colloïdale de sphérules dans une phase liquide qui est constituée par la fraction du liquide à encapsuler qui n'est pas retenue à l'intérieur des liposomes. Le rapport du volume de liquide encapsulé à l'intérieur des liposomes au volume total de ce liquide est, en général, de l'ordre de 1 à 10%.

Par conséquent, si le liquide à encapsuler présente une grande valeur — ce qui est le cas le plus général lorsque ce liquide est une solution d'une substance biologiquement active — il est nécessaire de récupérer la fraction de ce liquide non encapsulé afin de l'utiliser pour d'autres opérations de formation de liposomes. Cette récupération va de pair avec la séparation des liposomes de ce liquide, puis implique sa purification et, en général, le réajustement de sa concentration en substance active (en effet, les opérations de séparation et de purification précitées entraînent l'utilisation de volumes plus ou moins grands de solvants et, par conséquent, une modification de la concentration du liquide renfermant la substance active).

La nécessité d'effectuer de telles opérations de purification et de réajustement de la concentration du liquide renfermant la substance active rend les procédés de fabrication de liposomes, qui sont décrits ci-dessus, difficiles à mettre en œuvre à l'échelle industrielle.

On a récemment décrit une méthode nouvelle (voir demande de brevet allemand DOS N° 2532317) qui remédie en grande partie à ces inconvénients. Selon celle-ci, on ajoute la solution à encapsuler à une solution du surfactif dans un solvant organique de densité inférieure à 1 et on traite ce mélange par un générateur de fréquences soniques ou ultrasoniques comme, d'ailleurs, dans l'art antérieur. On obtient ainsi, à ce stade, une suspension, dans le liquide organique, de microglobules désignées ici par le terme précurseurs de liposomes, c'est-à-dire de microgouttelettes du liquide à encapsuler sous forme de vésicules dont la paroi est constituée d'une couche de surfactif dont les molécules sont orientées de la manière suivante: la fonction X est en contact avec la phase aqueuse, c'est-à-dire tournée vers l'intérieur de la vésicule, tandis que la fonction Y est dirigée en sens contraire, c'est-à-dire qu'elle baigne dans le milieu organique contenant, toujours dessous, un excès du lipide.

Puis on centrifuge cette suspension en présence du milieu aqueux dans lequel on désire constituer la solution de liposome.

Pendant la centrifugation, les précurseurs de liposomes quittent la phase organique supérieure et, sous l'influence de la force centrifuge, pénètrent dans la phase aqueuse. Ce faisant, elles traversent l'interphase, laquelle comprend une membrane lipidique constituée de molécules de l'excès de surfactif dissous dans le solvant organique qui se sont orientées conformément à la position relative des deux phases. Lors de cette traversée, les précurseurs acquièrent une seconde couche de surfactif dont les molécules sont orientées, cette fois, en sens contraire, l'ensemble des deux couches formant alors une pellicule liposomique XY-YX normale. On obtient ainsi directement une solution de liposomes dans le milieu aqueux désiré.

Ainsi, en résumé, ce procédé se compose de deux phases. Au cours de la première phase, on forme, sous l'effet d'une vibration ultrasonique, une dispersion de globules du liquide à encapsuler, ces globules ayant des dimensions colloïdales (c'est-à-dire un diamètre de l'ordre de 20 à 100 nm) dans un liquide insoluble ou faiblement soluble dans l'eau. Ces globules sont délimités par une pellicule monomoléculaire du composé X-Y dont les groupements hydrophiles X sont tournés vers l'intérieur des globules, qui est occupé par le liquide à encapsuler, les groupements hydrophobes Y étant, au contraire, tournés vers l'extérieur des globules qui consiste en la phase non aqueuse. Ces globules, bien qu'ils ne constituent pas, à proprement parler, des liposomes, car ils ne sont pas délimités par une couche bimoléculaire de ce composé, peuvent néanmoins être considérés comme une ébauche de liposomes, chacun d'eux renfermant le même volume du liquide à encapsuler que les liposomes obtenus finalement. Il est donc justifié que, dans la présente description, ces globules soient désignés par le terme précurseur de liposomes.

En dosant convenablement les proportions respectives du liquide aqueux à encapsuler, du solvant organique et du composé de formule X-Y, au cours de cette première partie du procédé, il est possible d'obtenir l'encapsulation dans les précurseurs de liposomes de la totalité du liquide à encapsuler utilisé.

Le rendement de l'encapsulation est donc souvent proche de la théorie, par exemple autour de 80%, ce qui constitue un progrès considérable sur l'art antérieur où les rendements sont de l'ordre de 1 à 20%.

La deuxième phase du procédé consiste à former les liposomes proprement dits. On peut supposer que cette formation résulte du fait que, en traversant la pellicule monomoléculaire du composé de formule X-Y qui est placée à l'interphase entre la couche liquide supérieure non aqueuse et la couche liquide inférieure aqueuse (la formation d'une telle pellicule monomoléculaire résulte, de manière connue en soi, des propriétés de ce composé: les groupements hydrophiles X sont, en effet, attirés par la couche liquide aqueuse alors que les groupements Y hydrophobes restent au sein de la couche liquide non aqueuse), chaque précurseur de liposomes entraîne une partie de cette pellicule qui s'associe avec la pellicule monomoléculaire du composé X-Y qui le délimite en formant une pellicule bimoléculaire de ce composé caractéristique des liposomes.

Ce procédé permet donc d'éviter les opérations de récupération, de purification et de réajustement de la concentration du liquide à encapsuler qui sont, comme il a été indiqué plus haut, nécessaires lors de la mise en œuvre des procédés classiques de fabrication de liposomes.

On comprendra également que ce procédé permet d'encapsuler, grâce à la formation de liposomes, des liquides dont on ne dispose que de très petites quantités, par exemple de l'ordre de 0,05 à 0,1 ml, qui seraient insuffisantes pour permettre la mise en œuvre des procédés connus de fabrication de liposomes décrits plus haut.

Ainsi, ce procédé qui présente, sur l'art antérieur, l'énorme avantage de permettre l'obtention directe d'une solution de liposomes sans devoir, au préalable, séparer ceux-ci du liquide à encapsuler et de les redisperser dans le milieu aqueux désiré, peut trouver des applications dans des domaines comme certains tra-

vaux de laboratoires de recherche ou d'analyse, dans lesquels les procédés connus de fabrication de liposomes seraient inapplicables.

On notera cependant que, malgré ses avantages, ce dernier procédé présente deux défauts: il nécessite d'abord d'employer un solvant de densité inférieure à 1 (de manière que la phase de précurseurs de liposomes constitue la phase supérieure du système lors de la centrifugation), ce qui impose certaines limitations de choix de solvant. De plus, l'opération de centrifugation est, en elle-même, une opération indésirable, car elle ne permet de traiter, à la fois, qu'une quantité relativement faible de produit et elle est longue et onéreuse. De plus, certains produits délicats supportent mal les accélérations considérables (de l'ordre de 10^{3-5} g) qui sont mises en jeu dans ces opérations de centrifugation.

La présente invention remédie entièrement à ces derniers défauts.

Ainsi, le procédé de l'invention dans lequel on forme, d'après l'art antérieur décrit ci-dessus, une solution de précurseurs de liposomes dans un solvant non hydrosoluble et contenant, dissous, un excès de lipide, puis dans lequel on met cette solution en présence d'une phase aqueuse de manière qu'on obtienne, dans celle-ci, une solution de liposomes, est caractérisé par le fait qu'on émulsionne ensemble les deux phases et qu'on soumet l'émulsion à une évaporation de manière que, par évaporation du solvant, il se forme une solution de liposomes dans ladite phase aqueuse.

En pratique, on peut placer dans un réacteur un solvant organique non soluble dans l'eau, y ajouter un lipide ou un mélange de produits constituant la fraction lipidique, puis ajouter la solution aqueuse à encapsuler et soumettre le tout à l'action des vibrations soniques ou ultrasoniques, de manière à homogénéiser le mélange et à former les vésicules de liquide aqueux encapsulé sous forme des précurseurs de liposomes. Puis on ajoute alors la portion désirée de phase aqueuse, par exemple une solution diluée d'un ou plusieurs sels dans l'eau, ou de l'eau pure, et on soumet le tout à l'action d'un agitateur-émulsionneur jusqu'à formation d'une émulsion régulière. Cette émulsion est constituée de microgouttes du solvant en suspension dans la phase aqueuse. Ces microgouttes contiennent, en solution, un nombre variable de précurseurs et un excès de lipide dissous. Puis, tout en maintenant stable l'émulsion par agitation (ou même après avoir stoppé l'agitation si l'émulsion est stable par elle-même), on soumet le contenu du réacteur à une évaporation. Par exemple, à pression ordinaire, on insuffle de l'air (ou un autre gaz) sur la surface du liquide (ou parallèlement à celle-ci), on recueille l'air chargé des vapeurs de solvant et on condense celui-ci dans un condenseur refroidi à basse température. Pendant l'évaporation, et en raison de la violente agitation, les précurseurs sont progressivement dispersés à travers l'interphase solvant/eau et, en conséquence, à travers la membrane de lipide qui sépare ces phases, et ils acquièrent ainsi la seconde couche de lipide les faisant passer, de l'état de précurseurs, à celui de liposomes vrais dissous ou dispersés dans la phase aqueuse.

Ce procédé, dont le rendement est très élevé (de l'ordre de 50 à 80%), est donc d'une simplicité extrême comparé à ceux de l'art antérieur; il permet de travailler sur de grandes quantités de solutions et le solvant utilisé peut avoir une densité supérieure à celle de l'eau, si désiré. Le choix des solvants est donc plus varié qu'avec le procédé de la demande DOS N° 2532317, ce qui permettra d'employer une grande variété de surfactifs, y compris, par exemple, les lipides solides à température ordinaire qui, normalement, doivent être mis en œuvre, dans les procédés habituels, à des températures supérieures à leur point de fusion, températures souvent nuisibles au produit à encapsuler.

D'autre part, par ce plus grand choix de solvants, il est plus facile d'en sélectionner un qui soit inerte vis-à-vis des lipides utilisés ou des substances à encapsuler.

On notera que des moyens autres que ceux décrits ci-dessus peuvent être utilisés pour la formation de l'émulsion et l'évaporation

du solvant. Par exemple, on peut émulsionner par secouage et évaporer sous pression réduite. Il est cependant nécessaire que la tension de vapeur, dans le procédé utilisé, soit notamment plus élevée que celle de l'eau; au cas contraire, il faudra rajouter de l'eau à intervalles répétés pendant l'évaporation.

Comme solvants, on peut utiliser par exemple:

- des hydrocarbures comme le benzène, le toluène, le cyclohexane, l'éther de pétrole, l'octane, etc.;
- des éthers comme l'éther diéthylique, diisopropylique, dibutyle, etc.;
- des esters comme l'acétate d'éthyle, de propyle, de butyle, le carbonate d'éthyle, etc.;
- des solvants halogénés comme le chloroforme, CCl_4 et CH_2Cl_2 , etc.

Comme surfactifs de formule X-Y, on peut utiliser, par exemple, des lipides ternaires ou complexes, des glycérides, cérides, étholides et stérides et, notamment, un ou plusieurs composés dans lesquels le groupement hydrophile X est l'un des groupes suivants: phosphato, carboxyle, sulfato, amino, hydroxyle et choline et le groupement hydrophobe Y est l'un des groupes suivants: groupe hydrocarbure aliphatique saturé ou non saturé (par exemple, alkyle ou alkylène), polyoxyalcoylène, groupe hydrocarbure aliphatique substitué par au moins un reste aromatique ou cycloaliphatique.

On notera qu'avec des groupements hydrophiles acides (phosphate, sulfato, etc.), on obtiendra des liposomes anioniques (appelés -), avec des groupements X tels qu'amino, on obtiendra des liposomes cationiques + et avec des groupes polyalcoyle, polyalcoyloxy ou polyglycol, des liposomes neutres.

On trouvera à titre d'exemple dans les ouvrages suivants: «Mc Cutcheon's Detergents & Emulsifiers» et «Mc Cutcheon's, 1976, Functional Material», Allured Publ. Company, Ridgewood, N.J. U.S.A., de nombreux surfactifs pouvant convenir à l'invention.

De préférence, on utilise comme composés XY des substances apparentées aux phospholipides, notamment les composés suivants: la lécithine, la phosphatidyléthanolamine, la lysolécithine, la lysophosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine, la phosphatidylinositol, la sphingomyéline, la cardiolipine, l'acide phosphatidique et les cérébrosides, le phosphate dicétylique, la phosphatidylcholine, la dipalmitoylphosphatidylcholine.

Comme lipides ne contenant pas de phosphore, on pourra utiliser, par exemple, la stéarylamine, la dodécylamine, l'hexadécylamine (Kodak Ltd), le palmitate de cétyle, le ricinoléate de glycéryle, le stéarate d'hexadécyle, le myristate d'isopropyle; les polymères acryliques amphotères, le sulfate de lauryle et de triéthanolamine, les sulfonates alcoylarylés, les amides d'acides gras éthoxylés, etc.

De plus, la fraction lipidique peut contenir, dissoutes, d'autres substances permettant de contrôler la stabilité et la perméabilité de la membrane liposomique. Comme tels composés, on pourra citer les stérols, notamment le cholestérol, le tocophérol, les phytostérols, les extraits de lanoline, etc.

Dans le présent procédé, on peut encapsuler pratiquement toutes les substances hydrosolubles et pour lesquelles les lipides constituant l'enveloppe des liposomes ne sont pas exagérément perméables. Outre les produits cités dans l'introduction, on citera des solutions aqueuses d'au moins une substance biologiquement active, notamment un chélatant des métaux, un enzyme, un médicament comme un antibiotique, etc.

Des exemples de telles substances figurent dans la référence suivante: «Targeting of drugs», G. Gregoriadis, «Nature» 265, [2] (1967), 407.

Comme phase aqueuse dans laquelle on obtient les liposomes, on peut utiliser de l'eau pure ou tout autre liquide aqueux approprié. De préférence, on utilise un liquide qui est destiné à servir de milieu final de dispersion pour les liposomes lors de leur utilisation, par exemple une solution aqueuse de chlorure de sodium. En

particulier, on peut utiliser une solution aqueuse de chlorure de sodium dite sérum physiologique ayant une concentration de 0,15 mol de ClNa/l (0,9% en poids), en vue d'obtenir directement, au cours de la deuxième phase du procédé, une dispersion de liposomes en milieu injectable dans l'organisme humain. Il apparaît ainsi un autre avantage du procédé selon l'invention, par rapport aux procédés connus de fabrication de liposomes, qui est de permettre l'obtention directe d'une suspension de liposomes dans un milieu aqueux choisi en fonction de l'utilisation finale des liposomes.

Bien entendu, il est également possible de séparer les liposomes du second liquide aqueux, par exemple si l'on désire éviter la présence de toute trace de la substance active non encapsulée lors de l'utilisation finale des liposomes. Cette séparation peut être facilement effectuée par tous moyens connus appropriés, par exemple par chromatographie sur gel.

Les exemples qui suivent illustrent l'invention de manière détaillée.

Exemple 1 :

Dans un flacon de Pyrex de 10 ml, on place 2 ml d'éther dibutylique et 1 ml de cyclohexane puis on ajoute 0,2 ml d'une solution d'insuline à 10 mg/ml dans du NaCl aqueux à 90/00 et ayant un pH de 3,0 (pH obtenu par acidification à l'aide d'acide chlorhydrique selon les moyens habituels). On ajoute ensuite 150 mg de 25 dipalmitoylphosphatidylcholine (composé lipophile-hydrophile) et, à température ordinaire, on soumet ce mélange hétérogène à l'action des ultrasons pendant 1 mn au moyen d'un générateur Branson modèle B 12 (20 kH, 150 W). Après ce traitement, on obtient une solution transparente contenant des microglobules de 30 solution d'insuline entourée d'une couche de surfactif dont les molécules sont orientées, la fonction hydrophile (phosphatidylcholine) vers l'intérieur et les groupes hydrophobes (chaîne hydrocarbonée) vers l'extérieur. Ces microglobules sont en suspension colloïdale dans la solution organique contenant, dissous, l'excès de surfactif non utilisé pour l'enrobage des microglobules.

On introduit alors cette solution organique dans un ballon contenant 30 ml de solution aqueuse de NaCl à 0,9% et, au moyen d'un agitateur émulsionneur, on émulsifie à 30°C la suspension organique dans la solution aqueuse. Après ce traitement, le milieu se compose en conséquence d'une dispersion de gouttelettes du solvant organique dans la solution aqueuse. Chaque gouttelette du solvant contient, en suspension, les microglobules 35 décrites ci-dessus et l'excès de surfactif dissous.

Au moyen d'une tubulure appropriée, on introduit alors dans 45 le flacon, à proximité immédiate de l'interface air-liquide, et tout en continuant à agiter à 30°C, un courant d'air qui, au contact des particules de l'émulsion, se charge des vapeurs du solvant organique; ce mélange d'air et de vapeurs est dirigé dans un condenseur (refroidi à -10°C) où se condense, en liquide, le solvant entraîné. Ce processus est poursuivi jusqu'à cessation de la condensation (environ 20-30 mn).

Après ce traitement, il reste dans le flacon approximativement 20 ml de solution transparente (NaCl à 90/00) contenant, en suspension, les capsules de liposomes, c'est-à-dire les microglobules décrites ci-dessus dont l'enveloppe consiste maintenant en une pellicule double de surfactif dont les fonctions hydrophiles sont dirigées aussi bien vers l'extérieur que vers l'intérieur de celle-ci, la couche extérieure de cette pellicule ayant été acquise au contact de l'excès de surfactif présent dans le solvant organique au moment de l'évaporation de celui-ci.

On prélève 2 ml de cette solution et les fait passer sur une colonne contenant 2,5 g de Séphadex G-50 (éluant, NaCl 0,15M + tampon phosphaté 0,05M à pH 7,5) et, par analyse des fractions de l'éluat, on constate que seuls 20-25% de la solution originale d'insuline ont échappé à l'encapsulation.

On remarquera donc que, par conséquent, la solution de liposomes telle qu'obtenue dans cet exemple peut être, dans la plupart

des cas, utilisée directement en thérapeutique sans nécessiter de purification ultérieure.

Exemple 2 :

5 On encapsule une solution aqueuse d'amyloglucosidase — renfermant 10 mg d'amyloglucosidase par millilitre de solution, dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,15 mol/l — en procédant de la manière suivante :

On ajoute 74 mg de lécithine et 0,1 ml de ladite solution 10 aqueuse d'amyloglucosidase à 3 ml d'éther diisopropylique et on soumet le mélange hétérogène ainsi obtenu à un traitement aux ultrasons (fréquence : 20 kHz; puissance de sortie : 150 W) pendant 2 mn, tout en le maintenant à une température inférieure à 30°C au moyen d'un bain réfrigérant.

15 On obtient ainsi un liquide transparent, d'apparence homogène, qui présente des reflets bleutés. On ajoute à ce liquide 15 ml de solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,15 mol/l et, comme décrit à l'exemple 1, on émulsifie la solution organique dans la phase aqueuse. Puis, tout en continuant à agiter, on fait passer, 20 sur l'émulsion, un courant d'azote qui se charge d'éther diisopropylique en vapeur. On poursuit l'évaporation jusqu'à élimination complète du solvant organique et à l'obtention d'une solution limpide (20-30 mn).

Ce liquide clair consiste en une suspension de liposomes — ayant des dimensions colloïdales — renfermant la solution aqueuse d'amyloglucosidase, dans une solution aqueuse de chlorure de sodium de 0,15M, et renfermant également une très faible quantité (de l'ordre de 5%) d'amyloglucosidase non encapsulée.

Suivant les utilisations envisagées, on peut utiliser cette suspension de liposomes soit telle quelle, soit après élimination de l'amyloglucosidase non encapsulée, par chromatographie sur gel (par exemple au moyen d'un gel de sépharose).

Exemple 3 :

On procède de la même manière que dans l'exemple 1, mais en utilisant, comme solution à encapsuler, 0,05 ml d'une solution aqueuse tamponnée (tampon phosphate 10 mM, pH 7,2) renfermant 0,5 mg/ml d'arabine cytosine dissoute dans une solution 40 aqueuse de chlorure de sodium 0,15M, et en employant, pour former la phase organique soumise au traitement aux ultrasons, 47 mg de cardioline et un mélange de 2,4 ml de dibutyléther et 0,6 ml de chloroforme.

Exemple 4 :

On procède comme dans l'exemple 1, mais en utilisant, comme solution à encapsuler, 0,1 ml d'une solution de penicillamine à 100 mg/ml, dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15M, et en employant, pour former la phase organique soumise 50 au traitement aux ultrasons, un mélange de 105 mg de lécithine et 35 mg de cholestérol et 3 ml d'acétate de butyle.

Exemple 5 :

On procède comme dans l'exemple 1, mais en utilisant, comme solution à encapsuler, 0,05 ml d'une solution de phosphate disodique de bétaméthasone à 150 mg/ml, dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,15M, et en employant, pour former la phase organique soumise au traitement aux ultrasons, un mélange 60 de 85 mg de lécithine et 45 mg de phosphatidyléthanolamine et 3 ml de 3-heptanone.

Exemple 6 :

On procède comme dans l'exemple 1, mais en utilisant, comme solution à encapsuler, 0,1 ml d'une solution du complexe acide 65 polyinosinique/acide polycitidilique [Poly (I). Poly (C)] à 1 mg/ml, dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,15M, et en employant, pour former la phase organique soumise au traitement aux ultrasons, un mélange de 60 mg de lécithine, 20 mg de stéary-

lamine et 15 mg de cholestérol et 3 ml de mélange diisopropyl-éther-acétate de butyle 1:1.

Exemple 7:

A 20 ml d'éther diisopropylique on ajoute 1,5 g de lécithine, 0,4 g de phosphatidylsérine et 0,5 g de cholestérol puis une solution de 1,8 mg d'actinomycine D dans 3 ml de tampon phosphate (0,1M, pH 7) et on soumet le tout aux vibrations, comme dans l'exemple 1, pendant environ 5 mn. Puis on ajoute 100 ml de tampon phosphate (0,1M, pH 7) et émulsionne ensemble les deux phases, comme décrit à l'exemple 1. Sans arrêter l'agitateur-émulsionneur, on relie le récipient laboratoire à une prise de pression réduite et abaisse progressivement la pression à 10 torrs tout en maintenant la température à 20-22°C. Après environ 45 mn, le mélange se présente sous forme d'une solution claire de liposomes

dont l'éther diisopropylique a été totalement éliminé. Par chromatographie d'un échantillon sur Séphadex, on constate que 88% de l'actinomycine D a été encapsulée.

5 *Exemple 8:*

On dissout 1 g de trypsine dans 30 ml de tampon phosphate (0,1M, pH 7) et on ajoute cette solution à 100 ml de dipropyléther contenant 30 g de phosphatidylinositol. On soumet le tout aux vibrations comme dans les exemples précédents, puis on ajoute 10 460 ml de solution aqueuse NaCl à 0,5%. On émulsionne le tout et, sous agitation à 15°C, on soumet l'émulsion à une pression de 10 torrs pendant 2-3 h. On obtient alors une solution de liposomes sous la forme d'un liquide clair. Par analyse d'un échantillon (chromatographie sur Séphadex G 50), on constate que le 15 rendement de l'encapsulation est de 85%.