



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 33518 B1**
- (51) Cl. internationale : **A61K 9/107; A61K 9/127;
A61K 31/232; A61K 31/455;
A61K 47/14; A61K 47/24**
- (43) Date de publication : **01.08.2012**
-
- (21) N° Dépôt : **34617**
- (22) Date de Dépôt : **10.02.2012**
- (30) Données de Priorité : **11.08.2009 FR 0955612**
- (86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/EP2010/061701 11.08.2010**
- (71) Demandeur(s) : **PIERRE FABRE MEDICAMENT, 45, place Abel Gance 92100 Boulogne-Billancourt (FR)**
- (72) Inventeur(s) : **KUNG, Elsa ; LEIGH, Mathew ; LEVERD, Elie ; VAN HOOGEVEST, Peter**
- (74) Mandataire : **CABINET PATENTMARK**
-
- (54) Titre : **COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT UN ESTER DE DHA DESTINEE A ETRE ADMINISTREE PAR VOIE PARENTERALE**
- (57) Abrégé : La présente invention cible une composition pharmaceutique destinée à être administrée par voie parentérale, comprenant des particules submicroniques d'ester de l'acide docosahexaénoïque, dispersées dans une phase aqueuse à l'aide d'un mélange d'au moins deux tensio-actifs choisis parmi a) au moins un ester d'acide gras polyoxyéthyléné et b) au moins un dérivé phospholipidique. La présente invention cible également le procédé de préparation de ladite composition pharmaceutique.

ABREGE DESCRIPTIF

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT UN ESTER DE DHA DESTINEE A ETRE ADMINISTREE PAR VOIE PARENTERALE

La présente invention cible une composition pharmaceutique destinée à être administrée par voie parentérale, comprenant des particules submicroniques d'ester de l'acide docosahexaénoïque, dispersées dans une phase aqueuse à l'aide d'un mélange d'au moins deux tensio-actifs choisis parmi a) au moins un ester d'acide gras polyoxyéthyléné et b) au moins un dérivé phospholipidique. La présente invention cible également le procédé de préparation de ladite composition pharmaceutique.



**COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT UN ESTER DE DHA
DESTINEE A ETRE ADMINISTREE PAR VOIE PARENTERALE**

5 La présente invention concerne une composition pharmaceutique pour administration parentérale comprenant un ester de l'acide docosahexaenoïque.

Les acides gras oméga-3 sont des acides gras polyinsaturés présents notamment dans les algues, les poissons gras (saumon, maquereau, sardine, thon), le colza, la noix, le soja... En règle générale, la classification des acides gras $CH_3-(CH_2)_n-COOH$ est basée sur la longueur de la chaîne carbonée (courte pour $n = 2$ à 4 , moyenne pour $n = 6$ à 8 et longue pour n égal ou > 10), le nombre de doubles liaisons (insaturé, mono ou polyinsaturé) et la position des doubles liaisons en partant du carbone du groupe carboxyle. Le système de référence ω indique quant à lui la longueur de la chaîne carbonée, le nombre de doubles liaisons et la position de la double liaison la plus proche du carbone ω en partant de ce carbone ω qui est par définition le dernier carbone de la chaîne, le plus loin du groupe carboxyle.

Les principaux acides gras du groupe $\omega 3$ sont :

- l'acide linoléique 18 : 3 (9, 12, 15) ou ALA
- 20 - l'acide eicosapentaenoïque 20 : 5 (5, 8, 11, 14, 17) ou EPA
- l'acide docosahexaenoïque 22 : 6 (4, 7, 10, 13, 16, 19) ou DHA

Les acides gras oméga-3 procurent de nombreux effets bénéfiques pour la santé humaine.

25 La demande de brevet WO 01/46115 A1 rappelle les bienfaits d'une alimentation à base d'huile de poisson, riche en EPA et en DHA, sur la diminution des accidents cardiovasculaires. Une forme parentérale d'EPA et de DHA y est mentionnée sous forme de suspension de particules globulaires obtenue par des méthodes bien connues de l'homme du métier par exemple en diluant un tensioactif détergent non ionique dans de l'eau, en le chauffant puis en ajoutant l'ester de DHA et d'EPA. Cette demande décrit 30 également des émulsions destinées à une administration intraveineuse contenant de

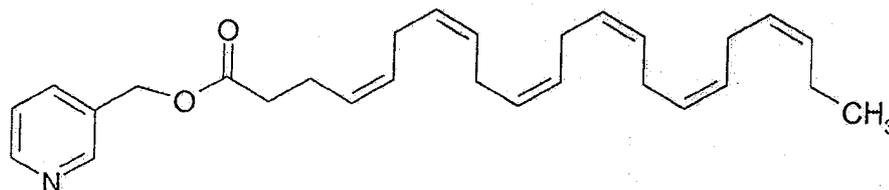
fu

l'huile de soja et des triglycérides via l'évocation d'une publication page 8 ligne 2 (Billman et al. 1997 Lipids 32 1161-1168).

Toutefois, il est difficile d'obtenir par un tel procédé des formulations parentérales stables prêtes à l'emploi, ou à reconstituer à partir de la forme lyophilisée, dont la taille moyenne des particules est inférieure à 100 nm, permettant l'incorporation d'une grande quantité de principe actif et ne contenant pas une trop forte proportion de tensioactif qui peut à terme se révéler toxique.

Parmi les esters de DHA, l'ester nicotinique ou pyridin-3-ylmethyl-cis-4,7,10,13,16,19-acide docosahexaénoïque est un ester très intéressant au niveau thérapeutique.

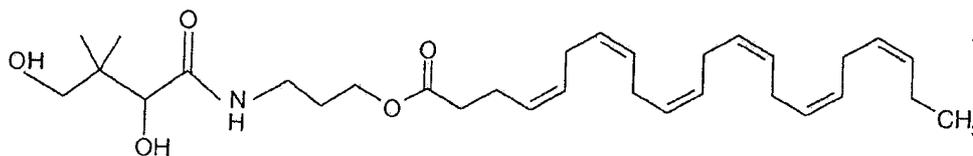
La formule développée de l'ester nicotinique de DHA ou pyridin-3-ylmethyl-cis-4,7,10,13,16,19-acide docosahexaénoïque est donnée ci-dessous :



La masse moléculaire est 419,60 g, correspondant à $C_{28} H_{37} NO_2$.

C'est un composé très lipophile (Log P voisin de 7) dont la solubilité à l'équilibre dans l'eau est $< 1 \mu\text{g/ml}$. Il est donc particulièrement difficile à formuler pour une administration parentérale.

Un autre ester de DHA particulièrement intéressant est l'ester panthénique de DHA, autrement appelé docosahexaénoate de panthényle, en particulier le monoester panthénique de DHA 2,4-dihydroxy-3,3-diméthylbutanamido) propyl docosa 4,7, 10, 13, 16, 19- hexanoate, ayant la formule A suivante :

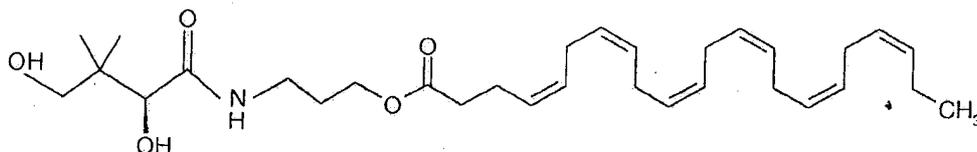


Handwritten signature

ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, énantiomères, diastéréoisomères, ou leur mélange, y compris les mélanges racémiques.

Plus particulièrement, l'ester peut être le monoester panthénique de DHA de formule B

5 suivante :



autrement appelé « ester DHA de D-panthénol ».

Ces esters sont très efficaces par exemple dans le traitement de la fibrillation auriculaire
10 comme indiqué dans WO 2007/147899. Ils agissent en tant que prodrogue, libérant le
DHA dans l'organisme, après hydrolyse.

Dans la présente invention, on entend désigner par « énantiomères » des composés
isomères optiques qui ont des formules moléculaires identiques mais qui diffèrent par
15 leur configuration spatiale et qui sont des images dans un miroir non superposables. On
entend par « diastéréoisomères » les isomères optiques qui ne sont pas des images dans
un miroir l'un de l'autre. Au sens de la présente invention, un « mélange racémique »
est un mélange en proportions égales des énantiomères lévogyre et dextrogyre d'une
molécule chirale.

20

Dans la présente invention, on entend désigner par « pharmaceutiquement acceptable »
ou « acceptable sur le plan pharmaceutique » ce qui est utile dans la préparation d'une
composition pharmaceutique qui est généralement sûr, non toxique et ni biologiquement
ni autrement non souhaitable et qui est acceptable pour une utilisation vétérinaire de
25 même que pharmaceutique humaine.

On entend désigner par « sels pharmaceutiquement acceptables » d'un composé des sels
qui sont pharmaceutiquement acceptables, comme défini ici, et qui possèdent l'activité
pharmacologique souhaitée du composé parent. De tels sels comprennent :

(1) les sels d'addition d'acide formés avec des acides minéraux tels que l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide sulfurique, l'acide nitrique, l'acide phosphorique et similaires ; ou formés avec des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide benzènesulfonique, l'acide benzoïque, l'acide camphresulfonique, l'acide citrique, l'acide éthane-sulfonique, l'acide fumarique, l'acide glucoheptonique, l'acide gluconique, l'acide glutamique, l'acide glycolique, l'acide hydroxynaphtoïque, l'acide 2-hydroxyéthanesulfonique, l'acide lactique, l'acide maléique, l'acide malique, l'acide mandélique, l'acide méthanesulfonique, l'acide muconique, l'acide 2-naphtalènesulfonique, l'acide propionique, l'acide salicylique, l'acide succinique, l'acide dibenzoyl-L-tartrique, l'acide tartrique, l'acide p-toluènesulfonique, l'acide triméthylacétique, l'acide trifluoroacétique et similaires ; ou

(2) les sels formés lorsqu'un proton acide présent dans le composé parent soit est remplacé par un ion métallique, par exemple un ion de métal alcalin, un ion de métal alcalino-terreux ou un ion d'aluminium ; soit se coordonne avec une base organique ou inorganique. Les bases organiques acceptables comprennent la diéthanolamine, l'éthanolamine, N-méthylglucamine, la triéthanolamine, la trométhamine et similaires. Les bases inorganiques acceptables comprennent l'hydroxyde d'aluminium, l'hydroxyde de calcium, l'hydroxyde de potassium, le carbonate de sodium et l'hydroxyde de sodium.

Les sels pharmaceutiquement acceptables préférés sont les sels formés à partir d'acide chlorhydrique, d'acide trifluoroacétique, d'acide dibenzoyl-L-tartrique et d'acide phosphorique.

Il devrait être compris que toutes les références aux sels pharmaceutiquement acceptables comprennent les formes d'addition de solvants (solvates) ou les formes cristallines (polymorphes) tels que définis ici, du même sel d'addition d'acide.

Les inventeurs ont découvert de façon surprenante qu'il était possible de préparer des compositions comprenant un ester de DHA et destinées à une administration par voie parentérale en utilisant une association de deux types de tensio-actifs, un ester d'acide gras polyoxyéthyléné et un dérivé phospholipidique.

La présente invention concerne donc une composition pharmaceutique destinée à être administrée par voie parentérale, comprenant des particules submicroniques d'ester de l'acide docosahexaénoïque, dispersées dans une phase aqueuse à l'aide d'un mélange
5 d'au moins deux tensioactifs choisis parmi a) au moins un ester d'acide gras polyoxyéthyléné et b) au moins un dérivé phospholipidique.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition ne contient comme tensioactif que les deux types de tensio-actifs a) et b).

10

L'ester de l'acide docosahexaénoïque peut être de toute sorte. Il peut en particulier s'agir d'un ester éthylique ou d'un ester avec une vitamine B tel que décrit dans la demande de brevet WO 2007/147899.

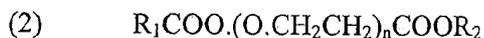
15 Dans un mode de réalisation de l'invention, il s'agit de l'ester nicotinique de DHA, c'est-à-dire le pyridin-3-ylmethyl-cis-4,7,10,13,16,19-acide docosahexaénoïque, ou de l'ester panthénique de DHA, en particulier le monoester panthénique de DHA 2,4-dihydroxy-3,3-diméthylbutanamido) propyl docosa 4,7, 10, 13, 16, 19- hexanoate, et plus particulièrement l'ester DHA de D-panthénol, qui sont particulièrement difficiles à
20 formuler pour une administration par voie parentérale.

Dans un mode de réalisation de la présente invention, la concentration en ester de l'acide docosahexaénoïque est supérieure ou égale à 10 mg/ml, par exemple, supérieure ou égale à 30 mg/ml.

25

Le premier agent tensio-actif (a) appartient au groupe des esters d'acides gras polyoxyéthylénés. Les esters d'acides gras polyoxyéthylénés peuvent être obtenus par réaction entre un acide gras et un oxyde d'éthylène ou un polyéthylène glycol.

30 En particulier, les esters d'acides gras polyoxyéthylénés selon l'invention ont la formule suivante (1) ou (2):



5 dans lesquels R, R₁ et R₂ représentent indépendamment l'un de l'autre le groupe alkyle ou alcényle de l'acide gras parent et n représente la longueur de la chaîne polymérique, en motifs oxyéthylène. n est par exemple, entre 10 et 60, par exemple entre 12 et 20, par exemple 15.

10 L'acide gras peut-être saturé ou insaturé. Il est hydroxylé. Les acides gras saturés les plus communs sont comme suit:

Nom commun	Nom IUPAC	Structure chimique	Abbr.	Point de fusion (°C)
Butyrique	acide butanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	C4:0	-8
Caproïque	acide hexanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	C6:0	-3
Caprylique	acide octanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	C8:0	16-17
Caprique	acide décanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	C10:0	31
Laurique	acide dodécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	C12:0	44-46
Myristique	acide tétradécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	C14:0	58.8
Palmitique	acide hexadécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	C16:0	63-64
Stéarique	acide octadécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	C18:0	69.9
Arachidique	acide éicosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	C20:0	75,5
Béhénique	acide docosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	C22:0	74-78
Lignocérique	acide Tétracosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	C24:0	

En conséquence, R, R₁ ou R₂ est, par exemple, une chaîne alkyle ou alcényle, p. ex.
 15 alkyle, linéaire ou ramifiée, par exemple linéaire, en C₃-C₂₃, par exemple en C₁₁-C₂₃,

par exemple en C₁₅-C₂₁, par exemple, l'acide gras est un acide gras saturé à longue chaîne, i.e. ayant plus de 16 atomes de carbone.

Dans un mode de réalisation l'acide gras a entre 12 et 24 atomes de carbone, par exemple, entre 14 et 22 atomes de carbone, par exemple entre 16 et 20 atomes de carbone, par exemple, il a 18 atomes de carbone, par exemple il s'agit de l'acide stéarique.

Il peut s'agir de mono ou de diester d'acides gras, ou d'un mélange de ceux-ci. Dans un mode de réalisation de l'invention, il s'agit d'un mélange de mono et di ester d'acide gras. Par exemple, l'ester d'acide gras polyoxyéthyléné est le macrogol-15 hydroxystéarate (dénomination commerciale: SOLUTOL HS15, fabricant: BASF, Ludwigshafen, Allemagne). C'est un agent solubilisant non ionique, constitué principalement de monoesters et de diesters de l'acide 12-hydroxystéarique et de macrogols obtenu par éthoxylation de l'acide 12-hydroxystéarique. Le nombre de moles d'oxyde d'éthylène ayant réagi par mole d'acide 12-hydroxystéarique est de 15. Il se présente sous forme d'une masse cireuse jaunâtre, très soluble dans l'eau.

En particulier les esters d'acides gras polyoxyéthylénés utilisables dans le cadre de la présente invention sont des tensioactifs non ioniques.

Le deuxième agent tensio-actif (b) appartient au groupe des dérivés phospholipidiques: il peut ainsi s'agir de lécithines d'origine naturelle, comme par exemple les lécithines de soja ou d'œuf, de phospholipides d'origine naturelle, comme par exemple les phospholipides de soja ou d'œuf, ou de phospholipides synthétiques, ou leur mélange. Il peut par exemple s'agir de phospholipides neutres tels que les phosphatidylcholines, comme par exemple le 1,2-dimyristoylphosphatidylcholine ou le 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine, et les phosphatidylethanolamines, par exemple les phosphatidylcholines, de phospholipides chargés négativement tels que les phosphatidylglycerols, comme par exemple le 1,2-dimyristoylphosphatidylglycerol, les phosphatidylserines, les phosphatidylinositols et les acides phosphatidiques, p. ex. les phosphatidylglycerols, ou de leurs mélanges. Par exemple, il s'agit d'un phospholipide

neutre tel qu'une phosphatidylcholine, ou il peut s'agir d'un mélange d'un phospholipide neutre et d'un phospholipide chargé négativement, par exemple du 1-palmitoyl-2-oléoylphosphatidylcholine et du 1,2-dimyristoylphosphatidylglycerol.

- 5 Dans le mélange d'un phospholipide neutre et d'un phospholipide chargé négativement, le pourcentage massique en phospholipide chargé négativement par rapport à la composition totale du mélange est inférieur à 10 %, par exemple, compris entre 1 % et 5 %, p. ex. égal à 3 %.
- 10 Il peut également s'agir d'un mélange d'une lécithine d'origine naturelle avec un phospholipide chargé négativement, en particulier d'une lécithine d'œuf avec le 1,2-dimyristoylphosphatidylglycerol.

Le ratio massique tensioactif de type a) / tensioactif de type b) peut être compris
15 entre 1/3 et 3/1 par exemple, il est de 1/1.

Les dérivés phospholipidiques ont la structure générale indiquée dans la figure 1.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le dérivé phospholipidique ne contient pas
20 de lécithine de soja ou de phospholipide de soja.

Dans un mode de réalisation les particules submicroniques sont des particules submicroniques telles que des micelles mixtes ou des vésicules ou des hybrides de structures micellaires et vésiculaires.

25

Une micelle mixte selon l'invention est une micelle, par exemple un agrégat, constituée par un mélange des deux types différents de tensioactifs (a) et (b), la tête polaire hydrophile des molécules de tensioactifs étant dirigée vers la phase aqueuse et la chaîne hydrophobe dirigée vers l'intérieur, en interaction avec l'ester de DHA.

30

Une vésicule selon l'invention est une structure dans laquelle les surfactants sont organisés suivant un arrangement en bi-couches identique à ce qui est présent dans les membranes cellulaires. Ces surfactants entourent une vacuole ou cavité aqueuse.

Un hybride de structure micellaire et vésiculaire selon l'invention est une structure
5 intermédiaire entre micelle mixte et vésicule, avec ou non l'existence de cette vacuole.

Ainsi, par exemple, la composition selon l'invention est une dispersion de micelles mixtes ou de vésicules ou d'hybrides de structures micellaires et vésiculaires. Par exemple, ces particules montrent des faces de fracture plane sous observation en
10 microscopie électronique après cryofracture.

Selon un mode de réalisation de la présente invention, la composition selon l'invention n'a pas la forme d'une émulsion.

15 Dans un mode de réalisation de la présente invention, les particules submicroniques ont une taille moyenne < 100 nm, par exemple comprise entre 25 et 70 nm, par exemple avec une polydispersité $< 0,5$, (la taille et la polydispersité sont déterminées par spectroscopie par corrélation de photons sur appareil Zetasizer de Malvern).

20 En plus des particules submicroniques décrites précédemment, la composition selon l'invention peut également contenir, de façon optionnelle:

- des agents anti-oxydants qui protègent l'ester de DHA, en particulier l'ester nicotinique ou l'ester panthénique de DHA, et en particulier l'ester DHA de D-panthénol, de l'oxydation par l'oxygène dissous dans la composition. Citons, à
25 titre d'exemples non limitatifs: l'acide ascorbique et ses dérivés, les composés libérant du dioxyde de soufre comme le métabisulfite de sodium, le gallate de propyle, le butylhydroxytoluène, le butylhydroxyanisole, le D,L- α -tocophérol, les dérivés de l'acide éthylènediaminetétracétique et leurs combinaisons. Leur teneur est comprise entre 0,01% et 1% (m/V), plus précisément entre 0,01% et 0,50%
30 (m/V). L'action des agents anti-oxydants est complétée de façon pertinente par la mise en œuvre de gaz inertes comme l'azote ou l'argon durant la fabrication et le conditionnement des compositions injectables.

- des agents régulateurs de pH. Ils sont connus de l'homme de l'art et incluent des acides et des bases, minéraux ou organiques, ainsi que des systèmes tampons. Leur utilisation permet de fixer le pH de la composition selon l'invention à une valeur comprise entre $\text{pH} = 4$ et $\text{pH} = 9$, compatible avec une administration par voie parentérale. Il peut ainsi s'agir d'acide ascorbique.
- des agents permettant d'ajuster l'osmolarité de la composition selon l'invention afin d'en assurer l'isotonie avec le sang. Ceux-ci sont par exemple des molécules neutres comme les carbohydrates, p. ex. des monosaccharides réduits ou non [par exemple glucose ou mannitol à une concentration $\leq 5\%$ (m/V)] ou des disaccharides [par exemple saccharose à une concentration $\leq 10\%$ (m/V)].
- l'eau pour préparations injectables comme milieu dispersant, par exemple une solution de glucose à 5% ou une solution de chlorure de sodium à 0,9%.

Les compositions selon l'invention se présentent sous forme de dispersions aqueuses prêtes à être administrées ou sous forme de dispersions lyophilisées qui sont reconstituées extemporanément avec de l'eau pour préparations injectables avant administration.

A titre d'exemple non limitatif, pour une concentration de 30 mg/ml – soit 3% (m/V) - en ester nicotinique de DHA, les concentrations en SOLUTOL HS15 et en dérivé phospholipidique sont respectivement comprises entre 2,5 et 5% (m/V) et 0 et 10% (m/V). Préférentiellement, une composition avec 5% (m/V) de SOLUTOL HS15 et 5% (m/V) de dérivé phospholipidique sera utilisée.

Les formulations indiquées dans le tableau 1 ci-dessous illustrent la présente invention. Elles ont été préparées par le premier procédé décrit ci-après.

	1	2	3	4
ester nicotinique de DHA	3,00 g	3,00 g	3,00 g	3,00 g
1,2-Dimyristoylphosphatidylcholine	5,00 g			
1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine		4,85 g	4,85 g	

1,2-Dimyristoylphosphatidylglycerol		0,15 g	0,15 g	0,15 g
Lécithine d'œuf				4,85 g
SOLUTOL HS15	5,00 g	5,00 g	5,00 g	5,00 g
Acide ascorbique			0,20 g	
Solution de glucose à 5 %	qsp 100 ml	qsp 100ml	qsp 100 ml	qsp 100 ml
Taille moyenne des particules	28,6 nm	52,0 nm	65,1 nm	50,6 nm
Polydispersité	0,4	0,3	0,1	0,2

La présente invention concerne en outre un procédé de préparation de la composition selon la présente invention qui comprend les étapes suivantes :

- 5 - disperser l'ester de DHA, en particulier l'ester nicotinique de DHA ou l'ester panthénique de DHA, en particulier le monoester panthénique de DHA de formule A ou de formule B, le(s) dérivé(s) phospholipidique(s) et l'ester d'acide gras polyoxyéthyléné, par exemple le SOLUTOL HS15, dans une solution aqueuse destinée à une administration parentérale, p. ex. une solution de glucose à 5%, sous agitation par exemple magnétique ou agitation à ancre, par exemple à 10 environ 700 tours/min., jusqu'à obtention d'une dispersion homogène mais turbide,
- 15 - homogénéiser la dispersion obtenue, par exemple à l'aide d'une turbine rotor / stator, (par exemple du type Labortechnik T25 (IKA) ou équivalent), p. ex. à environ 13500 tours/min, puis d'un homogénéiseur haute pression, (par exemple du type EMULSIFLEX C-5 (AVESTIN) ou équivalent), p. ex. à une pression comprise entre 1300 et 1600 bars,
- 20 - stériliser la formulation colloïdale obtenue, par exemple par passage à travers un filtre stérilisant 0,2 µm tel que du type DURAPORE® de MILLIPORE ou équivalent.

Le procédé peut en outre comprendre une étape supplémentaire consistant à répartir le filtrat stérile, en atmosphère aseptique, dans les articles de conditionnement primaire propres et préalablement stérilisés.

Ce conditionnement primaire est par exemple soit une ampoule scellée, soit un flacon fermé par un bouchon en élastomère et une capsule de sertissage, soit une seringue pré-remplie prête à l'administration.

5

Dans un procédé alternatif, les deux tensioactifs a) et b) peuvent être co-homogénéisés préalablement dans la solution aqueuse destinée à une administration parentérale telle qu'une solution de glucose à 5%, avant ajout de l'ester de DHA, en particulier l'ester nicotinique ou l'ester panthénique de DHA, en particulier le monoester panthénique de DHA de formule A ou de formule B et homogénéisation finale.

Dans un autre procédé alternatif, le tensioactif a) et l'ester de DHA sont homogénéisés préalablement à l'ajout du tensio-actif b) suivi de l'homogénéisation de l'ensemble. Un solvant est ensuite ajouté, par exemple, un mélange alcool/ eau, par exemple éthanol/eau, par exemple 15,8:1 v/v respectivement, et l'homogénéisation se poursuit. Le solvant est ensuite éliminé par séchage sous vide. Le complexe obtenu est alors dilué dans une solution de glucose à 5%. La dispersion obtenue est éventuellement homogénéisée, par exemple à l'aide d'un homogénéiseur à haute pression. La formulation obtenue est stérilisée par passage au travers d'un filtre 0,22µm, tel que décrit précédemment.

15
20

Les éventuels agents anti-oxydants, agents régulateurs de pH et/ou agents isotonisants sont dissous dans la phase aqueuse soit avant, soit après l'homogénéisation.

Dans un mode de réalisation, la composition pharmaceutique selon l'invention est destinée à être administrée par voie intraveineuse, par voie intra-artérielle, par voie intracardiaque, par voie sous-cutanée, par voie intradermique, par voie intramusculaire, par voie intra-rachidienne, par voie intrathécale, par voie intra-péritonéale, par voie intraoculaire, par voie intra-ventriculaire, par voie intra-péricardique, par voie intradurale ou par voie intra-articulaire.

25
30

De façon générale, les compositions selon l'invention sont administrées par voie intraveineuse, telles quelles ou après dilution dans des solutions physiologiquement acceptables comme les solutions de glucose à 5% ou les solutions de chlorure de sodium à 0,9%.

5

Ces compositions peuvent aussi être administrées par voie intra-artérielle, par voie intracardiaque, par voie sous-cutanée, par voie intradermique, par voie intramusculaire ou par voie intra-rachidienne.

10 La présente invention concerne en outre une composition pharmaceutique selon l'invention, pour utilisation à titre de médicament.

Le médicament est destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies cardiovasculaires, par exemple choisies parmi l'arythmie supraventriculaire et/ou
15 ventriculaire, la tachycardie et/ou la fibrillation, p. ex. la fibrillation atriale; à la prévention et/ou au traitement de maladies représentées par des défauts de la conduction électrique des cellules du myocarde; à la prévention et/ou au traitement de facteurs de risques multiples de maladies cardiovasculaires, par exemple choisis parmi
20 p. ex. les dyslipidémies mixtes, thrombose artérielle et veineuse provoquée par l'hyperactivité de facteur II (thrombine) de coagulation sanguine et/ou agrégation plaquettaire, et/ou l'hypertension artérielle; à la prévention primaire ou secondaire et/ou au traitement de maladies cardiovasculaires dérivant de l'arythmie supraventriculaire et/ou ventriculaire, de la tachycardie, de la fibrillation et/ou de défauts de la conduction
25 électrique induits par l'infarctus du myocarde, avantageusement de la mort subite; et/ou au traitement post-infarctus.

L'invention sera mieux comprise à la lumière des figures et des tests sur la fibrillation atriale qui suivent :

30

La figure 1 représente la structure générale des dérivés phospholipidiques.

La figure 2 représente la mesure des périodes réfractaires atriales chez les porcs anesthésiés lors de l'administration des compositions selon l'invention (bolus 10mg/kg d'ester nicotinique de DHA + perfusion 10mg/kg d'ester nicotinique de DHA sur 40 minutes) avec une fréquence de stimulation de 120 bpm et de 150bpm..

5

La figure 3 représente la mesure des périodes réfractaires atriales chez les porcs anesthésiés lors de l'administration de compositions comparatives (contre-exemples) (bolus 10mg/kg d'ester nicotinique de DHA + perfusion 10mg/kg d'ester nicotinique de DHA sur 40 minutes) avec une fréquence de stimulation de 150 bpm.

10

Exemple 1 :

A titre d'exemple, l'activité des compositions selon l'invention indiquées dans le tableau 1 dans le traitement de la fibrillation atriale est parfaitement mise en évidence par le test de pharmacologie décrit ci-après.

15

Des porcs Landrace mâles (22-25 kg) sont anesthésiés à l'isoflurane (1,5-3%). Les animaux sont ensuite intubés et ventilés afin de garder les valeurs de gaz artériel dans des limites physiologiques. Une thoracotomie gauche est effectuée au niveau du quatrième espace intercostal. L'artère et la veine mammaire sont isolées, des cathéters sont insérés dans la veine pour l'administration des produits à tester et dans l'artère pour mesurer la pression artérielle et recueillir des prélèvements de sang. Un lit péricardique est pratiqué. Un électrocardiogramme (ECG) atrial est enregistré en continu, trois électrodes sont placées sur l'épicarde et suturées. De ce fait, l'ECG nous renseigne uniquement sur l'étage atrial. Deux électrodes bipolaires sont également placées sur l'oreillette gauche: elles permettront de stimuler électriquement l'oreillette à une fréquence donnée.

20

25

Protocole expérimental :

Après une période de récupération suffisante, la détermination de la période réfractaire atriale sous condition contrôle peut commencer. Un train continu de stimuli (S1) est lancé à un voltage très faible (0,1 V), insuffisant pour entraîner le cœur.

30

Progressivement le voltage est augmenté (par pas de 0,1 V) pour trouver le seuil de stimulation qui permet de suivre la fréquence imposée. La recherche de ce seuil est réalisée à chaque fréquence de stimulation. Il y a 4 fréquences de stimulation, 90, 120, 150 et 180 bpm. Si le porc a une fréquence cardiaque de base supérieure à 90 bpm la première fréquence de stimulation n'est pas réalisée. De même, si la fréquence de base est faible (< 90 bpm) la dernière fréquence de stimulation (180 bpm) testée n'entraîne pas toujours le cœur. Une fois le seuil trouvé, le voltage de la stimulation S1 (train de 10 stimuli) est égal à 2 fois le seuil, et le voltage de l'extrastimulus S2 est égal à 4 fois le seuil. Tous les 10 S1, un extrastimulus S2 est déclenché pendant la période réfractaire (c'est à dire 80 ms après le dernier S1, la période réfractaire attendue est d'au moins 100 ms), puis tous les 10 stimuli S1, l'extrastimulus est écarté du dernier S1 (incrément de 5 ms en 5 ms) jusqu'à ce qu'il enclenche lui même un battement. L'intervalle le plus long n'entraînant pas de réponse à S2 est la période réfractaire atriale. La période réfractaire est évaluée 3 fois de suite (expression de la moyenne), à 4 fréquences de stimulation différentes soit 12 mesures. Le produit à tester est administré sous forme de bolus puis de perfusion sur 40 min (temps nécessaire pour évaluer toutes les périodes réfractaires). Les seuils ne sont pas recalculés, les périodes réfractaires sont tout de suite mesurées (5 min après la fin du bolus). Si le produit est actif les périodes réfractaires doivent être augmentées par rapport à la phase contrôle.

Il est remarquable de constater que seules les compositions de l'invention répondent positivement à ce test pharmacologique comme l'illustrent les figures 2 et 3.

Les contre-exemples sont des formulations très proches des formulations selon l'invention comme indiquées dans le tableau 2 ci-dessous mais elles démontrent une activité pharmacologique inférieure ou négative.

Tableau 2

	Contre-exemple 1	Contre-exemple 2	Contre-exemple 3
ester nicotinique de DHA	3,00 g	3,00 g	3,00 g
1,2-Dimyristoylphosphatidylcholine			2,00 g

SOLUTOL HS15	5,00 g		
Polysorbate 80		2,50 g	
Triglycérides à chaîne moyenne		2,50 g	
1,2-Dimyristoylphosphatidylglycerol			0,50 g
Solution de glucose à 5 %	qsp 100 ml	qsp 100 ml	qsp 100 ml

On remarque donc que l'absence d'un des tensioactifs ((a) ou (b) respectivement contre-exemple 3 et contre-exemple 1) dans la composition destinée à l'administration parentérale contenant l'ester nicotinique de DHA ou l'utilisation d'un autre tensioactif que le a) ou b) (contre exemple 2) ne permet pas d'obtenir l'activité désirée.

Exemple 2 : Formulation injectable comprenant l'ester panthénique de DHA de formule B

- 10 POPC = 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine
 EPCS = phosphatidyl choline d'œuf
 DMPG = 1,2, dimyristoylphosphatidylglycerol

1- Procédé de préparation par complexation en présence de solvant :

15

Le solutol HS 15 et l'ester panthénique de DHA de formule B sont mélangés à une température de 50°C jusqu'à homogénéisation. Les phospholipides sont ensuite ajoutés et le mélange est placé sous agitation magnétique à une température de 50°C pour une durée de 1 h à 1h30 sous atmosphère inerte par exemple, sous nitrogène. L'éthanol et l'eau, par exemple, éthanol/eau [15,8 :1 v/v], sont ajoutés au mélange et l'agitation est poursuivie sous atmosphère inerte jusqu'à ce que les lipides soient complètement dispersés. Le mélange est alors traité pendant 30 min par ultrasonication pour obtenir la dispersion complète des phospholipides. La dispersion résultante est placée sous vide pendant au moins 24 h afin d'éliminer le solvant et l'eau.

25

fact

Le complexe est dilué dans une solution de glucose à 5 %. Si la dispersion est opaque, elle est homogénéisée à l'homogénéiseur à haute pression jusqu'à ce que la dispersion soit translucide, claire. Elle est stérilisée sur filtre PVDF 0.22 µm.

5 2- Procédé de préparation par mélange d'ester panthénique de DHA avec une dispersion de phospholipides et de Solutol HS 15.

Les phospholipides, le Solutol HS 15 et la solution de glucose à 5% sont pesés et le mélange est agité magnétiquement et chauffé à 60°C jusqu'à ce qu'une dispersion soit
10 obtenue. La dispersion est ensuite traitée à l'homogénéiseur à haute pression en cycle jusqu'à ce qu'une dispersion, claire et/ ou translucide soit obtenue.

L'ester panthénique de DHA de formule B est ensuite ajouté à ladite dispersion et le mélange est homogénéisé pendant 1 à 2 minutes à 13500 rev/min. La dispersion est
15 traitée à l'homogénéiseur à haute pression en cycle jusqu'à ce qu'une dispersion, claire et/ ou translucide soit obtenue, par exemple un maximum de 5 cycles. La dispersion est filtrée à travers in filtre PVDF de 0.22 µm.

20 3- Procédé de préparation par mélange de l'ester panthénique de DHA, des phospholipides et du Solutol HS 15.

Tous les composants sont pesés dans un flacon, un barreau aimanté est ajouté et le flacon est scellé sous atmosphère inerte par exemple sous azote. Le mélange est agité pendant 30 min ou jusqu'à ce qu'une dispersion homogène soit obtenue. La dispersion
25 est homogénéisée à 13500 rev/min pendant 1 à 2 minutes et traitée par un homogénéiseur à haute pression jusqu'à ce qu'une dispersion translucide et/ ou claire ou qu'une transmission constante soit obtenue, par exemple après 6 cycles. Les formulations sont filtrées sur filtres à 0.22µm et l'aspect visuel, l'apparence au microscope, le pH, la transmission et la taille des particules est déterminée à T0 et après
30 stockage pendant 2 semaines à 4°C, 25°C et 40°C.

Le développement de la formulation a été réalisé avec les compositions suivantes indiquées dans le tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3

Composés	30 mg P-DHA/ml POPC formulation		30 mg P-DHA/ml EPCS formulation	
	poids	Concentration (mg/ml)	poids	Concentration (mg/ml)
Ester panthénique de DHA de formule B	3,00	30,1	3,00	30,1
Solutol HS 15	5,00	49,8	5,00	49,8
POPC	4,85	48,5	-	-
EPC S	-	-	4,85	48,5
DMPG	0,15	1,6	0,15	1,6
5 % glucose solution	87,00	870,1	87,00	870,1
Total	100	1000,1	100	1000,1

5

Les exemples ci-dessus ont permis d'évaluer si l'ester panthénique de DHA, par exemple l'ester panthénique de formule B, peut être combiné directement avec les excipients pour former un complexe qui peut ensuite être dilué avec une solution de glucose à 5% pour donner une dispersion convenant à l'injection.

10

La composition obtenue selon chacun des 3 procédés de préparation est analysée.

L'aspect visuel et l'apparence de la formulation sont observés au microscope, le pH, la transmission et la taille des particules est mesurée à T0 et après stockage de 2 à 4 semaines à 4, 25 et 40°C.

15

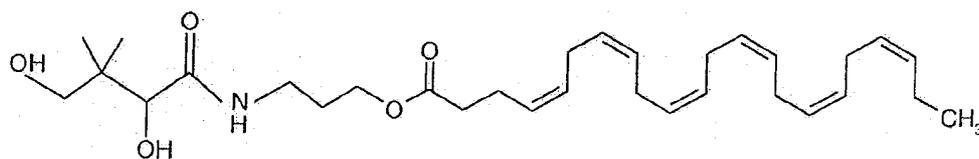
La conclusion issue de ces observations est que des compositions contenant 30 mg d'ester panthénique de DHA de formule B par ml de Solutol HS 15 et de POPC ou de EPCS avec DMPG et une solution de glucose à 5% peuvent être préparées selon ces trois procédés décrits. Le pH est resté stable sur les deux semaines, la taille des
5 particules est restée inférieure à 100 nm. Aucun pic de dégradation n'a été observé sur les chromatogrammes HPLC.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique destinée à être administrée par voie parentérale, comprenant des particules submicroniques d'ester de l'acide docosahexaénoïque, dispersées dans une phase aqueuse à l'aide d'un mélange d'au moins deux tensio-actifs choisis parmi a) au moins un ester d'acide gras polyoxyéthyléné et b) au moins un dérivé phospholipidique.

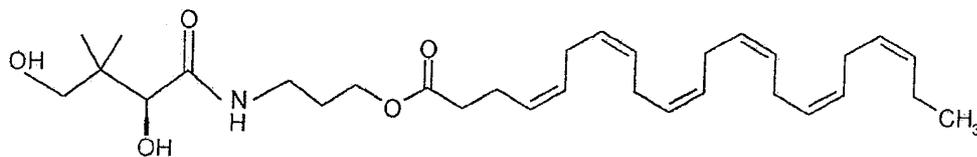
2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'ester d'acide docosahexaénoïque est l'ester nicotinique.

3. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'ester d'acide docosahexaénoïque est l'ester panthénique de DHA de formule A suivante :



ou l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, énantiomères, diastéréoisomères, ou leur mélange, y compris les mélanges racémiques.

4. Composition pharmaceutique selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'ester d'acide docosahexaénoïque est l'ester panthénique de DHA de formule B suivante :



5. Composition pharmaceutique selon la revendication 1 à 4, caractérisée en ce que l'ester d'acide gras polyoxyéthyléné est le macrogol-15 hydroxystéarate.

25 6. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le dérivé phospholipidique est choisi parmi les lécithines d'origine naturelle, comme par exemple les lécithines de soja ou d'œuf, les

phospholipides d'origine naturelle, comme par exemple les phospholipides de soja ou d'œuf, les phospholipides synthétiques, ou leur mélange.

- 5 7. Composition pharmaceutique selon la revendication 6, caractérisée en ce que le dérivé phospholipidique est un mélange d'un phospholipide neutre et d'un phospholipide chargé négativement.
- 10 8. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la concentration en ester de l'acide docosahexaénoïque est supérieure ou égale à 10 mg/ml, avantageusement supérieure ou égale à 30 mg/ml.
- 15 9. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une dispersion de micelles mixtes ou de vésicules ou d'hybrides de structures micellaires et vésiculaires.
10. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les particules submicroniques ont une taille moyenne < 100 nm, plus précisément comprise entre 25 et 70 nm, avec une polydispersité < 0,5.
- 20 11. Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- disperser l'ester de DHA, en particulier l'ester nicotinique de DHA défini dans la revendication 2 ou l'ester panthénique de DHA défini aux revendications 3 ou 4, le(s) dérivé(s) phospholipidique(s) et l'ester d'acide gras polyoxyéthyléné, en particulier le SOLUTOL HS15, dans une solution aqueuse destinée à une administration parentérale, en particulier une solution de glucose à 5%, sous agitation, en particulier à environ 700 tours/min., jusqu'à obtention d'une dispersion homogène mais turbide,
 - homogénéiser la dispersion obtenue, par exemple à l'aide d'une turbine rotor / stator, en particulier à environ 13500 tours/min, puis d'un homogénéiseur haute pression, en particulier à une pression comprise entre 1300 et 1600 bars,
- 25
- 30

- stériliser la formulation colloïdale obtenue par exemple par passage à travers un filtre stérilisant 0,2 μm .

12. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisées en ce qu'elle est destinée à être administrée par voie intraveineuse, par voie intra-artérielle, par voie intracardiaque, par voie sous-cutanée, par voie intradermique, par voie intramusculaire par voie intra-rachidienne, par voie intrathécale, par voie intra-péritonéale, par voie intraoculaire, par voie intraventriculaire, par voie intra-péricardique, par voie intra-durale ou par voie intra-articulaire.
13. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 12, pour utilisation à titre de médicament.
14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13, caractérisée en ce que le médicament est destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies cardiovasculaires, avantageusement choisies parmi l'arythmie supraventriculaire et/ou ventriculaire, la tachycardie et/ou la fibrillation, par exemple, la fibrillation atriale ; à la prévention et/ou au traitement de maladies représentées par des défauts de la conduction électrique des cellules du myocarde ; à la prévention et/ou au traitement de facteurs de risques multiples de maladies cardiovasculaires, par exemple choisis parmi l'hypertriglycémie, l'hypercholestérolémie, les hyperlipidémies, les dyslipidémies, avantageusement les dyslipidémies mixtes, thrombose artérielle et veineuse provoquée par l'hyperactivité de facteur II (thrombine) de coagulation sanguine et/ou agrégation plaquettaire, et/ou l'hypertension artérielle ; à la prévention primaire ou secondaire et/ou au traitement de maladies cardiovasculaires dérivant de l'arythmie supraventriculaire et/ou ventriculaire, de la tachycardie, de la fibrillation et/ou de défauts de la conduction électrique induits par l'infarctus du myocarde, avantageusement de la mort subite ; et/ou au traitement post-infarctus.

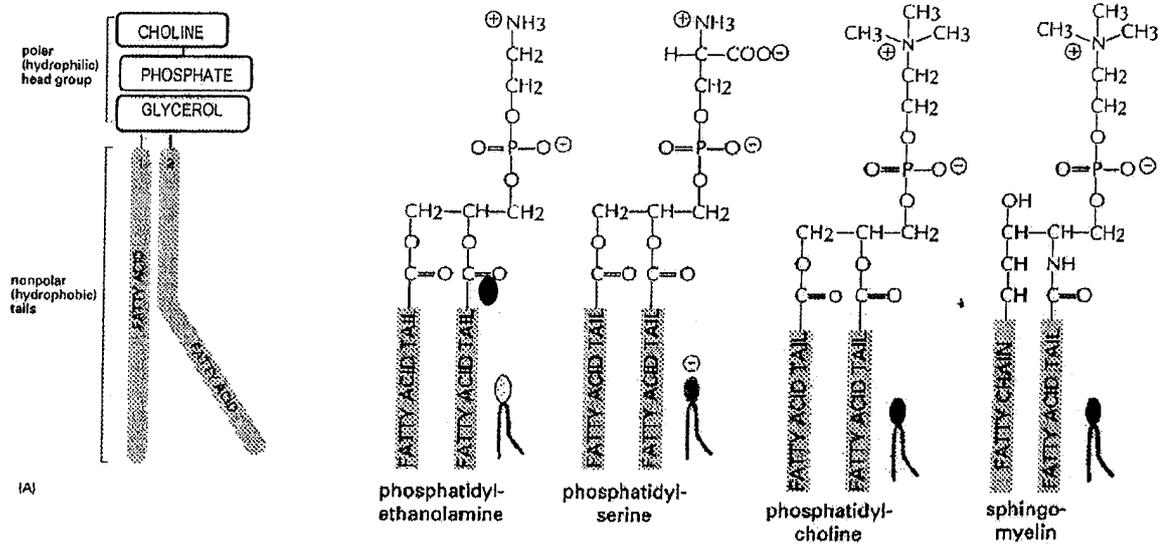


FIG. 1

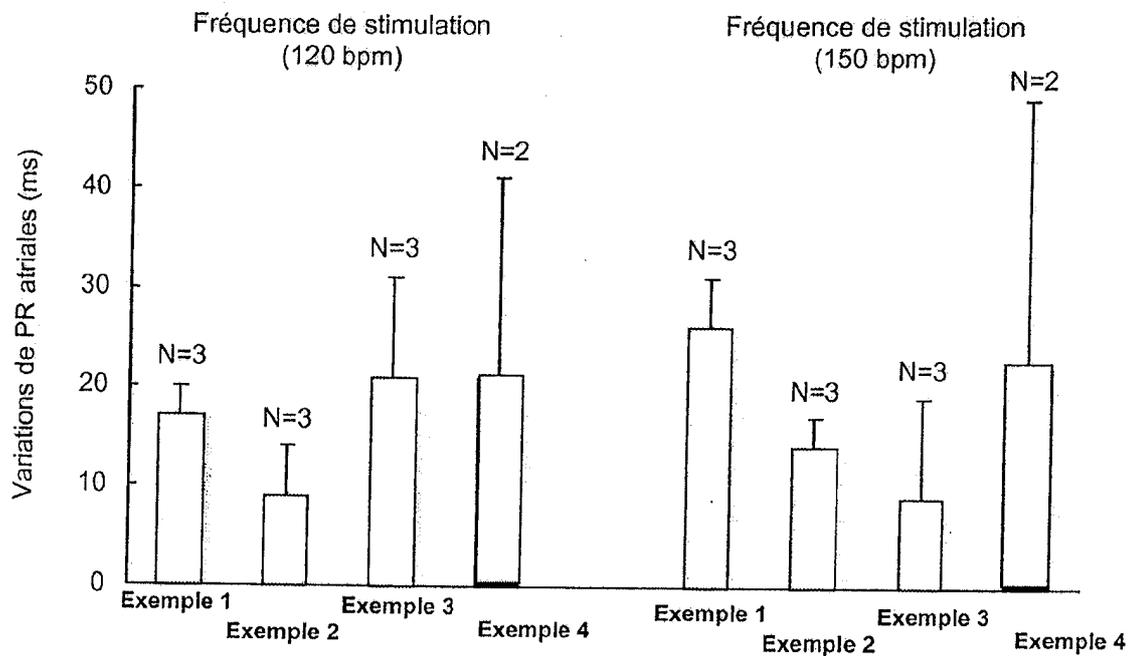


FIG. 2

just

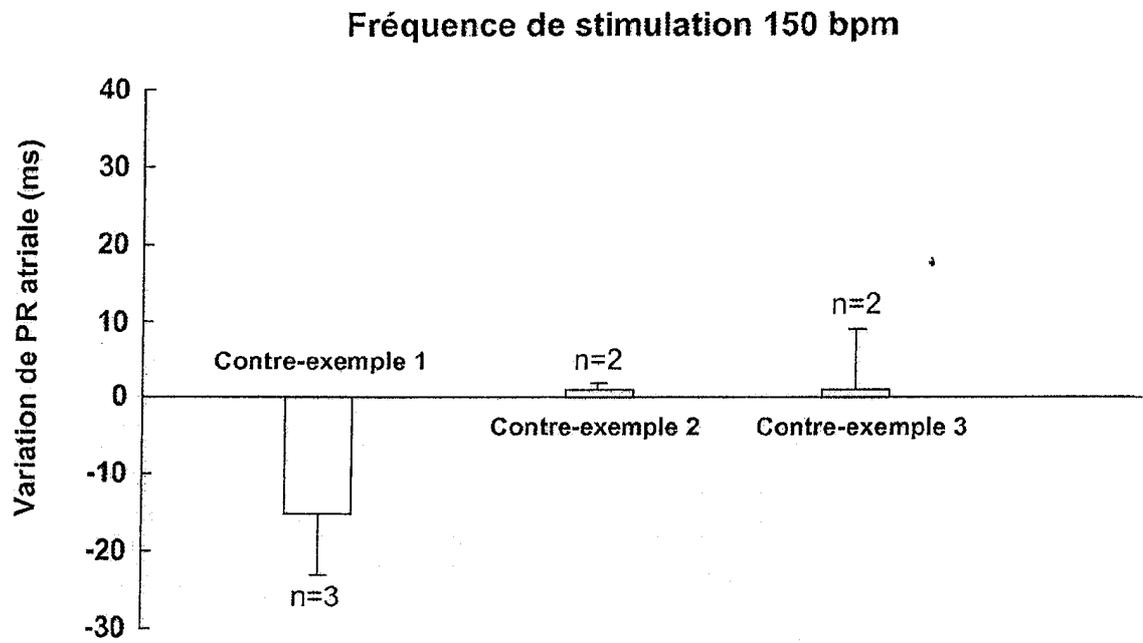


FIG.3