



HAL
open science

Développement et caractérisation physico-chimique d'une nouvelle forme galénique à base d'Amphotéricine B adaptée à la voie orale et pulmonaire

Lyes Mehenni

► **To cite this version:**

Lyes Mehenni. Développement et caractérisation physico-chimique d'une nouvelle forme galénique à base d'Amphotéricine B adaptée à la voie orale et pulmonaire. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR156 . tel-02128484

HAL Id: tel-02128484

<https://theses.hal.science/tel-02128484>

Submitted on 14 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHARMACIE

Préparée au sein de : Université de Rouen Normandie

Développement et caractérisation physico-chimique d'une nouvelle forme galénique à base de l'amphotéricine B pour une administration adaptée à la voie orale ou à la voie pulmonaire

Présentée et soutenue par
Lyes MEHENNI

Thèse soutenue publiquement le 07 MARS 2018
devant le jury composé de

Monsieur Mohamed SKIBA	MCU-HDR / DC2N INSERM U1239/ Université de Rouen-Normandie	Directeur de thèse
Madame Malika LAHIANI-SKIBA	MCU-HDR / DC2N INSERM U1239/ Université de Rouen-Normandie	Codirecteur de thèse
Monsieur Hatem FESSI	Professeur/ LAGEP UMR CNRS 5007/ Université Claude Bernard- Lyon	Rapporteur
Monsieur Jean-Christophe OLIVIER	Professeur/ U1070/ Université de Poitiers	Rapporteur

Thèse dirigée par : Dr. Mohamed SKIBA, DC2N INSERM U1239
Co-dirigée par Dr. Malika LAHIANI-SKIBA, DC2N INSERM U1239



Remerciements

Au seuil de ce travail, je remercie vivement :

- **Monsieur le docteur Mohamed SKIBA**, responsable du laboratoire de pharmacie galénique et de biopharmacie, mon directeur de thèse, qui m'a proposé le sujet, à qui j'exprime mon profond respect pour les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer, sa disponibilité et ses critiques dont j'ai bénéficié pour la mise au point de cette étude.
- **Madame le docteur Malika LAHIANI-SKIBA** qui m'a encadré dans ce travail, à qui j'exprime ma gratitude pour son soutien, ses orientations et son écoute.
- **Monsieur le docteur François HALLOUARD** pour son aide dans la concrétisation des résultats de recherche.
- **Monsieur le professeur Jean-Claude DEBOUZY** et son équipe de m'avoir permis d'effectuer l'étude de caractérisation par RMN et ESR des formulations réalisées.
- **Monsieur le professeur Hatem FESSI**, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse et de juger ce travail.
- **Monsieur le professeur Jean-Claude OLIVIER**, qui me fait l'honneur de juger ce travail et qui m'a apporté son aide précieuse pour la validation de l'étude *in-vitro* de la déposition pulmonaire par l'impacteur NGI®
- Le personnel du laboratoire pour leur contribution à ce travail.

J'adresse particulièrement mes remerciements à :

- **Monsieur le professeur Pierre-Yves RENARD**, directeur-adjoint de l'école doctorale normande de chimie (EDNC) de m'avoir permis d'intégrer la formation doctorale.
- **Madame le docteur Nassima HAMDI-ZIANI**, manager général des laboratoires WANYLAB-ALGERIE qui a financé cette thèse et qui m'a apporté son amical soutien que je n'oublierai pas.

Je dédie cette thèse à :

- La mémoire de ma défunte **grand-mère** décédée récemment qui attendait impatiemment la finalisation de ma thèse. Que dieu ait son âme.
- **Mon père**
- **Ma mère**
- **Mes frères et sœur**
- **Mes neveux et nièces**
- **Mes amis**

Resumé

Les infections fongiques peuvent s'exprimer sous différentes formes (leishmaniose cutanée ou viscérale, aspergillose pulmonaire à caractère allergique ou invasive) et connaissent une recrudescence dans les pays développés en affectant principalement les personnes immunodéprimées comme les cancéreux, les malades ayant subis des greffes d'organes ou les patients atteints du VIH. Ces infections sont une cause de mortalité chez 30% des sujets atteints. L'approche médicamenteuse conventionnelle consiste en l'administration par voie intraveineuse (IV) d'antifongiques. L'Amphotéricine B (AmB), un antibiotique de la famille des polyènes, reste à ce jour l'un des agents les plus efficaces dans le traitement des infections fongiques systémiques mais entraîne aussi des effets indésirables comme une néphrotoxicité aiguë après injection. Pour améliorer l'index thérapeutique de cette molécule active, nous avons développé différents outils galéniques adaptés à d'autres voies d'administration. Dans un premier temps, nous avons mis au point des liposomes à base de céramides végétales, adaptés pour une administration orale et dans le but de traiter la leishmaniose viscérale. Ces liposomes ont été testés dans un modèle *in vitro* Estomac/Duodénum pour mimer les conditions physiologiques et ont montré une bonne stabilité dans un tel milieu avec un taux d'encapsulation satisfaisant. Des liposomes formulés à partir de Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)/Dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG) et encapsulant l'AmB ont été étudiés à l'aide de la résonance magnétique nucléaire (RMN³¹P et ¹H) et par résonance paramagnétique électronique (RPE). Ces liposomes, dont la composition pourrait être adaptée pour une administration par voie pulmonaire, ont été utilisés comme modèle membranaire pour une étude des interactions du principe actif dans la matrice liposomale. Enfin, nous décrivons le développement et la caractérisation physico-chimique d'une nouvelle génération de dispersions solides amorphes sphériques formulées à base de polymères de cyclodextrines très hydrophiles et d'amphotéricine B. Les formulations ont été obtenues sous forme de poudre sèche par spray-drying, une méthode de séchage par atomisation. Ces systèmes ont été caractérisés par diverses techniques : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), spectroscopie Raman, granulométrie laser, microscopie électronique à transmission et microscopie électronique à balayage. La distribution aérodynamique de ces dispersions solides amorphes a été évaluée à l'aide d'un impacteur à cascades afin de tester leur intérêt pour des applications potentielles par voie pulmonaire.

Abstract

Resumé	4
Abstract.....	6
Tables des matières.....	8
Abréviations	12
Introduction Générale	15
Etat de l’art.....	21
I. Le principe actif: Amphotéricine B	22
Structure.....	22
Propriétés physico-chimiques	23
Etats d’agrégation de l’AmB	23
Mode d’action	24
Principales Indications.....	25
II. Leishmaniose et les infections fongiques.....	26
Leishmaniose	26
l’Aspergillose pulmonaire.....	27
Les différents types d’aspergilloses pulmonaires	27
Formes médicamenteuses commercialisées à base d’AmB.....	30
Limites et inconvénients des traitements actuels	31
III. La vectorisation.....	33
Les diverses formes d’Amphotéricine B	37
IV. La voie pulmonaire et la thérapie par inhalation.....	40
Composition du fluide pulmonaire.....	41
Mécanismes de déposition des particules solides inhalées dans les poumons	42
Intérêt de la voie pulmonaire	45
L’absorption systémique médicamenteuse par voie pulmonaire : quelles limites ? Quelles contraintes?	46
V. Les cyclodextrines (CDs) naturelles ou modifiées et les polymères de cyclodextrines (PolyCDs).....	49
Les complexes d’inclusion avec les cyclodextrines	51
Diagrammes de solubilité de phases	53
Dérivés de cyclodextrines.....	55
Applications des cyclodextrines à l’Amphotéricine B	55
Les polymères de cyclodextrines	57
VI. Nouvelle génération de dispersions solides amorphes sphériques (DS 4.0) à base de polymères de cyclodextrines	60
Définition.....	60
Classification des dispersions solides.....	61
Préparation des dispersions solides	63

Matériels & Méthodes	85
Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	86
Spectrophotométrie d'absorption UV-visible.....	87
Analyse calorimétrique différentielle (DSC).....	87
Analyse thermogravimétrique (ATG).....	88
Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	88
Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)	88
Résonance paramagnétique électronique (ESR).....	89
Spectroscopie RAMAN	89
Estimation de la taille des particules sèches obtenues par spray-drying par la technique de granulométrie laser.....	90
Evaluation de la forme par microscopie à balayage électronique (MEB)	90
Analyse granulométrique par diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	90
Microscopie électronique à transmission par coloration négative.....	90
Modèle artificiel Duodénum-Estomac	91
Composition.....	91
Synthèse des polymères de cyclodextrines	91
Etude <i>in vitro</i> de la lyodisponibilité des dispersions solides amorphes à base de polymères decyclodextrines	91
Evaluation de la distribution aérodynamique des particules solides par l'impacteur à cascades NGI®	92
Travaux Personnels	94
Chapitre 1	95
Développement et caractérisation de liposomes d'amphotéricine B à base de céramides végétales pour une administration par voie orale	95
Resumé	95
Chapitre 2	103
Etude des interactions de l'Amphotéricine B dans la matrice liposomale par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par résonance paramagnétique électronique (RPE)	103
Resumé	103
Chapitre 3	115
Préparation et caractérisation de microsphères d'Amphotericine B obtenues par la méthode de séchage par atomisation.....	115
Resumé	115
Chapitre 4	149
Développement et caractérisation physico-chimique de dispersions solides amorphes sphériques formulées à base de polymères de cyclodextrines cationiques et d'Amphotéricine B pour des applications potentielles par voie pulmonaire.	149
Resumé	149

Discussion Générale	161
Conclusion & Perspectives	172
Références Bibliographiques	175

Matériels & Méthodes	81
Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	82
Spectrophotométrie d'absorption UV-visible.....	83
Analyse calorimétrique différentielle (DSC).....	83
Analyse thermogravimétrique (ATG).....	84
Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	84
Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)	84
Résonance paramagnétique électronique (ESR).....	85
Spectroscopie RAMAN	85
Estimation de la taille des particules sèches obtenues par spray-drying par la technique de granulométrie laser.....	86
Evaluation de la forme par microscopie à balayage électronique (MEB)	86
Analyse granulométrique par diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	86
Microscopie électronique à transmission par coloration négative.....	86
Modèle artificiel Duodénum-Estomac	87
Composition.....	87
Synthèse des polymères de cyclodextrines	87
Etude <i>in vitro</i> de la lyodisponibilité des dispersions solides amorphes à base de polymères decyclodextrines	87
Evaluation de la distribution aérodynamique des particules solides par l'impacteur à cascades NGI®	88
Travaux Personnels	90
Chapitre 1	91
Développement et caractérisation de liposomes d'amphotéricine B à base de céramides végétales pour une administration par voie orale	91
Resumé	91
Chapitre 2	100
Etude des interactions de l'Amphotéricine B dans la matrice liposomale par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par résonance paramagnétique électronique (RPE)	100
Resumé	100
Chapitre 3	112
Préparation et caractérisation de microsphères d'Amphotericine B obtenues par la méthode de séchage par atomisation.....	112
Resumé	112
Chapitre 4	146
Développement et caractérisation physico-chimique de dispersions solides amorphes sphériques formulées à base de polymères de cyclodextrines cationiques et d'Amphotéricine B pour des applications potentielles par voie pulmonaire.	146
Resumé	146

Discussion Générale	158
Conclusion & Perspectives	169
Références Bibliographiques	172

Abréviations

AmB : Amphotéricine B

L-AmB : Liposomal Amphotericin B

PolyCD : Polymère de cyclodextrine

LC : Leishmaniose cutanée

LV : Leishmaniose viscérale

API : Aspergillose pulmonaire invasive

PA : Principe actif

BCS : Biopharmaceutical classification system

DMPC : 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine

DMPG : 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol

DPPC : dipalmitoyl-phosphatidylcholine

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RPE: Résonance paramagnétique électronique

HPLC : High performance liquid chromatography

ASD : Amorphous solid dispersion

SUV : Small unilamellar vesicle

MLV: Multi lamellar vesicle

CER: Céramide

CHO: Cholestérol

EPC: Egg-phosphatidylcholine

FDA: Food and drug association

ICH: International conference of harmonization

DSAS : Dispersion solide amorphe et sphérique

RF : Fraction respirable

FPF : Fraction des particules fines

MMAD: Mass median aerodynamic diameter

m-SLF: modified-Simulated lung fluid

IV: Intraveineuse

Ph.Eur : Pharmacopée européenne

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Introduction Générale

Au cours des 25 dernières années, l'incidence des infections fongiques systémiques chez l'homme a fortement augmenté. La principale raison est l'accroissement du nombre de patients atteints d'une infection VIH avancée, des immunodéprimés ayant reçu une chimiothérapie anticancéreuse ou un traitement immunosuppresseur lors d'une transplantation d'organe. L'aspergillose pulmonaire est une infection invasive fongique causée par un champignon appelé «Aspergillus» (1), et plus particulièrement «*Aspergillus Fumigatus*».

La maladie peut être exprimée sous différentes formes : l'aspergillome, l'aspergillose bronchopulmonaire allergique, l'aspergillose chronique et celle plus virulente et cause de mortalité qui est l'aspergillose invasive pulmonaire(2). Compte tenu de ses aspects multiples, de la dangerosité potentielle et du taux de survie considérablement bas qui est associé aux formes les plus graves, l'aspergillose pulmonaire est encore à l'heure actuelle dévastatrice sur le plan clinique.

L'approche médicamenteuse conventionnelle consiste en l'administration par voie intraveineuse (IV) d'antifongiques et l'Amphotéricine B (AmB) reste à ce jour l'un des agents les plus efficaces dans le traitement des infections fongiques. Cette molécule active n'est cependant pas résorbée après une administration orale et ne peut être administrée que par voie parentérale, non sans inconvénients. En effet, cette voie requiert l'administration de doses élevées, nécessaires à l'obtention de concentrations systémiques suffisantes pour obtenir un effet thérapeutique au niveau pulmonaire, qui sont également la cause d'effets secondaires indésirables, notamment une néphrotoxicité cumulative, et d'interactions médicamenteuses importantes. La voie parentérale est aussi très contraignante (forme galénique stérile, besoin d'un personnel médical,..), non dépourvue de risques pour le patient (risques d'infections à l'injection,..) et d'un coût élevé.

Différentes spécialités pharmaceutiques à base d'AmB sont disponibles sur le marché pour une administration principalement par voie IV. L'un des premiers médicaments, commercialisé sous le nom de Fungizone®, se présente sous forme d'une dispersion micellaire à base de déoxycholate de sodium comme solubilisant. Dans le but de réduire la toxicité que cet agent tensioactif occasionne, des formulations lipidiques d'AmB administrables par voie IV ont par la suite été développées. Il s'agit de la spécialité AmBisome® sous forme de liposomes ou encore des spécialités Amphocil® et Abelcet® sous forme de complexes lipidiques (7). Ces dernières formulations permettent de réduire nettement les effets secondaires observés après administration de la formulation d'AmB

déoxycholate, mais ne les éliminent pas totalement (3). De plus, elles présentent un coût de traitement onéreux, à titre d'exemple pour le flacon d'AmBisome dosé à 50mg, le coût du traitement est estimé à 150 euros sachant que la dose optimale est en moyenne de l'ordre de 40 mg/kg/jour. (4)

L'objectif de ce présent travail est de développer de nouvelles formulations afin d'augmenter l'efficacité de cet agent fongique tout en diminuant sa toxicité, de permettre une meilleure tolérance pour le patient et ce, à moindre coût.

Beaucoup de principes actifs d'intérêt thérapeutique montrent des limites lors d'une utilisation par voie orale du fait de leur faible solubilité et/ou d'une rapide dégradation au niveau du transit gastro-intestinal. Pourtant, et durant les dernières décennies, de nombreux systèmes de délivrance ont été développés tels que les systèmes muco-adhésives, les systèmes matriciels, les microparticules, les systèmes réservoirs afin d'encourager cette voie d'administration simple.

Une formulation orale d'amphotéricine B pourrait être appropriée dans le cadre d'un traitement prophylactique pour les patients à haut risque ou pour traiter les infections fongiques. Cette voie d'administration pourrait permettre également d'améliorer l'observance du traitement et de limiter les effets secondaires. Bien que l'amphotéricine B *per os* montre une absorption médiocre, le développement de formulations orales à base de cet agent fongique et sous différentes formes possibles a déjà fait l'objet d'une recherche poussée : nanoparticules amorphes de médicaments(5), nanotubes de carbone (6), microparticules de chitosan(7), nanoparticules cubiques(8), nano-émulsions (9), nanoparticules de gélatine (10), nanoparticules polymériques(11) ou encore nanoparticules solides lipidiques (12).

Une forme vectorisée sous forme liposomale administrée non pas par voie parentérale mais par voie orale pourrait être une alternative thérapeutique intéressante. En effet, ce type de vecteurs présente de nombreux avantages comme une capacité d'encapsulation élevée et un meilleur ciblage du site d'action (13). Dans cette optique et dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons formulé dans un premier temps des liposomes d'AmB à base de céramides végétales, phospholipides adaptés à la voie orale. Les céramides représentent l'un des constituants des membranes cellulaires cytoplasmiques et un élément important dans la construction et la stabilité de la bicouche phospholipidique. Les céramides végétales, composées essentiellement de glucosylcéramides, ont été incorporées dans diverses

préparations de liposomes, en comparaison avec des liposomes de phosphatidylcholine. Les différentes formulations liposomales ont été testées dans un « modèle artificiel Estomac-Duodénum » pour évaluer leur stabilité par voie orale.

Dans un second temps, nous avons étudié un modèle membranaire, composé de liposomes d'AmB formulés à base de deux types de phospholipides (DMPC : Dimyristoylphosphatidylcholine et DMPG : 1,2-Dimyristoylphosphorylglycerol), par les techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN du ^1H et ^{31}P) et de résonance paramagnétique électronique (RPE). Le but était de retenir une formulation liposomale optimisée d'un point de vue rapport molaire entre les différents types de phospholipides et la molécule active, pour une meilleure stabilité et efficacité des liposomes d'AmB dans le cadre d'une autre voie possible d'administration comme la voie pulmonaire. En effet, une alternative thérapeutique à la voie orale classique serait de localiser ces antifongiques directement dans le poumon en utilisant la voie inhalée afin d'améliorer l'index thérapeutique en concentrant directement la dose administrée au niveau du site d'infection tout en minimisant les concentrations systémiques.

Enfin, toujours dans l'optique de développer une forme galénique ciblant la voie pulmonaire, nous avons mis au point des formulations à base d'AmB et de polymères de cyclodextrines, ces derniers constituant un outil galénique innovant pour l'obtention de Dispersions Solides Amorphes Sphériques (DSAS). Ces formulations originales se présentent sous forme d'une poudre sèche obtenue par la méthode spray-drying (séchage par atomisation) avec pour avantages d'être hautement dispersible, chimiquement stable et adaptée à une administration par inhalation. Cette nouvelle et quatrième génération de dispersions solides (DS.04) pourrait constituer une approche thérapeutique originale et prometteuse dans le cadre de la prévention et du traitement de l'aspergillose pulmonaire.

Le présent document de thèse est divisé en deux majeures parties :

- Une première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui expose les pathologies des leishmanioses cutanée et viscérale, de l'aspergillose pulmonaire et ses différentes manifestations, et les traitements actuellement disponibles sur le marché.

Dans le but de pallier aux limites et inconvénients des traitements actuels, nous présentons dans un premier temps l'intérêt de l'utilisation de liposomes à base de céramides végétales adaptés à la voie orale, forme vectorisée pour l'encapsulation de l'AmB dans l'objectif principal de diminuer la toxicité rénale de cet agent antifongique.

Dans un second temps, nous évoquons l'intérêt de l'utilisation de la voie pulmonaire pour le traitement spécifique de l'aspergillose invasive et nous abordons les limites et les contraintes de l'absorption systémique par voie pulmonaire.

Enfin, nous présentons l'intérêt de l'utilisation des polymères de cyclodextrines, un nouvel excipient original pour l'élaboration d'une nouvelle génération de dispersions solides amorphes sphériques. Ces dispersions solides chargées en AmB sont obtenues sous forme d'une poudre sèche par une méthode de séchage par atomisation (spray-drying) et sont destinées à une inhalation (aérosol sec) en vue du traitement de l'aspergillose pulmonaire invasive.

Nous rappelons l'historique de l'élaboration des dispersions solides amorphes, de la 1^{ère} génération à la nouvelle et 4^{ème} génération à base de polymères de cyclodextrines qui permet de conserver le principe actif à l'état amorphe sans problème de recristallisation. Un article sous forme de revue générale reprend les différentes méthodes de préparation des dispersions solides destinées principalement à une administration par voie orale.

“Hallouard F, **Mehenni L**, Lahiani-Skiba M, Anouar Y, Skiba M. Solid Dispersions for Oral Administration: An Overview of the Methods for their Preparation. Current Pharmaceutical Design. 2016 Jul 25”

- La deuxième partie sera consacrée aux travaux de recherche effectués et se présente sous forme de 2 articles publiés, 1 article en cours de correction et 1 article en rédaction.

- Le premier article décrit le développement d'une nouvelle formulation de liposomes à base de céramides végétales destinée à la voie orale :

“Skiba-Lahiani M, Hallouard F, **Mehenni L**, Fessi H, Skiba M. Development and characterization of oral liposomes of vegetal ceramide based amphotericin B having enhanced dry solubility and solubility. Material Sciences Engineering C Material Biological Application. 2015 Mar; 48 :145–9.”

Le second travail publié aborde l'étude des interactions de l'amphotéricine B dans un modèle membranaire liposomal composé d'un mélange de phospholipides phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol par RMN ^{31}P et ^1H et par RPE :

“Debouzy JC, **Mehenni L**, Crouzier D, Lahiani-Skiba M, Nogue G, Skiba M. NMR and ESR study of amphotericin B interactions with various binary phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol membranes. International Journal of Pharmaceutics. 2017 Apr 15; 521 (1–2):384–94.”

Un troisième article en cours de correction décrit le développement et la caractérisation physico-chimique d'une nouvelle génération de dispersions solides amorphes sphériques formulées à base de polymères de cyclodextrines et d'amphotéricine B :

“**L.Mehenni**, M.Lahiani-Skiba, G.Ladam, F.Hallouard and M.Skiba”. Preparation and characterization of Spray Dried Microspheres of amphotericin B- Powder Technology

Un quatrième article en cours de rédaction décrit le développement et la caractérisation physico-chimique de dispersions solides amorphes sphériques formulées à base de polymères de cyclodextrines cationiques et d'amphotéricine B pour des applications potentielles par voie pulmonaire :

“**L.Mehenni**, M.Lahiani-Skiba, F.Hallouard and M.Skiba”. Development and characterization of spray-dried Spherical Amorphous Solid Dispersions based cationic polymers of cyclodextrins and amphotericin B for pulmonary administration.

Etat de l'art

I. Le principe actif: Amphotéricine B

Structure

L'Amphotéricine B (AmB) est un antibiotique antifongique de la famille des polyènes produit naturellement par la culture d'un actinomycète *Streptomyces nodosus*(4).

C'est un produit hémi-synthétique, dérivé d'un produit de fermentation. La molécule a été découverte et isolée pour la première fois en 1956, et sa structure chimique complète a été établie en 1970.

Sa formule brute est $C_{47}H_{73}NO_{17}$ (Figure 1).

La molécule a une masse molaire de 924,079 Da.

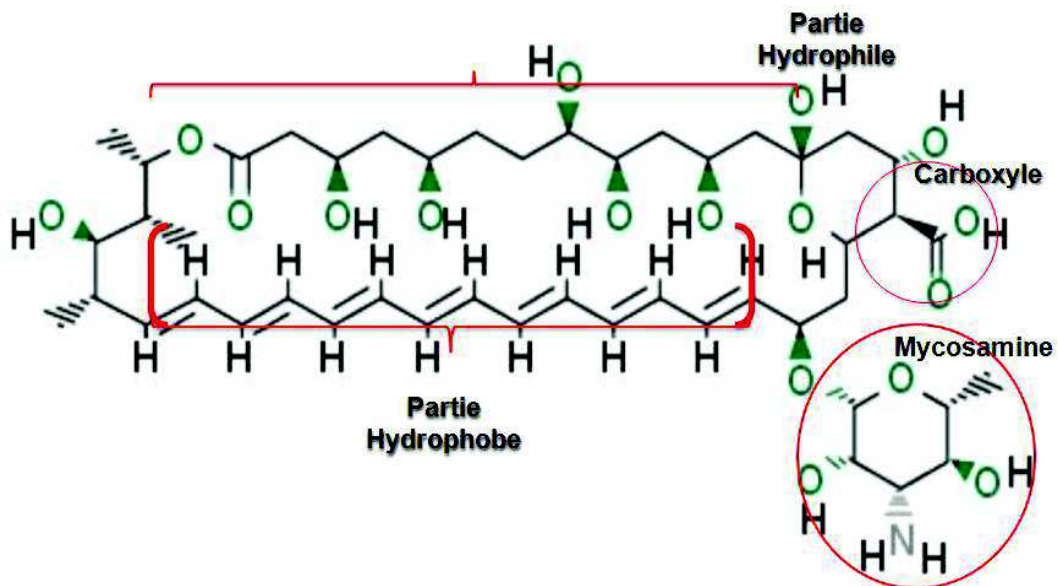


Figure 1 : Structure chimique de l'amphotéricine B

La molécule se décompose en:

- une partie apolaire hydrophobe (sept doubles liaisons conjuguées), responsable de l'intense spectre d'absorption UV, ce qui permet de l'étudier par méthodes spectroscopiques ;
- une partie polaire hydrophile, composée de groupements hydroxyles, une fonction mycosamine (pKa = 10) et une fonction carboxylique (pKa = 5.5). Elle présente donc un caractère amphiphile.

Son spectre d'absorption présente des maxima d'absorption à 362, 381 et 405nm (Ph eur.).

Propriétés physico-chimiques

L'AmB se présente sous forme de poudre de couleur jaune orangée, hygroscopique, pratiquement insoluble dans l'eau (solubilité environ 1 µg/ml) et sensible à la lumière dans les solutions diluées. Sa solubilité peut être augmentée dans les milieux à pH < 2 et pH > 11. L'AmB est plus soluble dans les solvants organiques tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une solubilité d'environ 30mg/ml. (14,15). Selon le système de classification biopharmaceutique (BCS), l'AmB appartient à la classe BCS IV, c'est-à-dire que ce principe actif présente une très faible solubilité aqueuse (à pH entre 2 et 7) ainsi qu'une très faible perméabilité limitant son absorption à travers la muqueuse gastro-intestinale.

Etats d'agrégation de l'AmB

L'AmB possède une capacité d'auto-agrégation en milieu aqueux influençant son activité pharmacocinétique. Cette propriété s'explique de part sa structure chimique, composée d'une longue chaîne d'alkyles, qui provoque son aggrégation dans l'eau à de très faibles concentrations, de l'ordre de 10^{-7} M (16). L'AmB se retrouve en solution sous forme de monomères pour la partie soluble et sous forme d'oligomères pour la partie insoluble. Une coloration jaune caractérise l'AmB en solution aqueuse et permet de distinguer les états d'agrégation de l'antifongique. Les oligomères confèrent une couleur jaune très opaque et les monomères solubles sont quant à eux transparents. En raison de sa nature amphiphile, les molécules d'AmB s'auto-associent et forment des poly-aggrégats au-delà d'une concentration de 0,2µg/ml qui représente la concentration micellaire critique (CMC) de l'AmB en solution (17). Les aggrégats sont formés à partir de l'interaction des chaînes polyéniques voisines entre elles (18) (Figure 2).

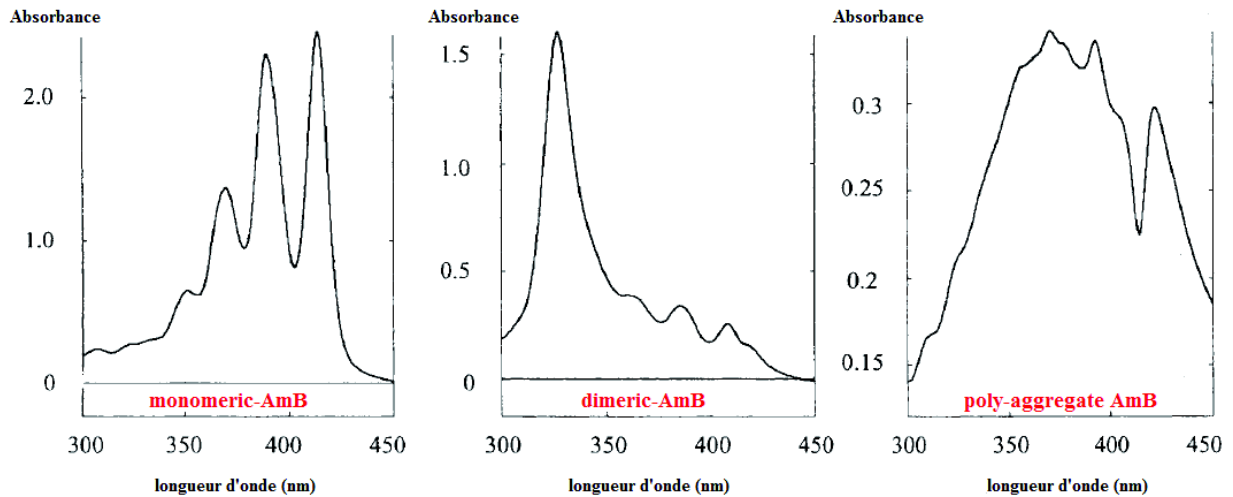


Figure 2 : Analyse spectroscopique des différents états d'aggrégation de l'AmB en solution

Mode d'action

Les polyènes interagissent avec les membranes biologiques et se lient principalement au cholestérol (Figure 3). L'AmB, macrolide polyène, est fongistatique et fongicide selon la concentration obtenue localement et la susceptibilité du germe en cause.

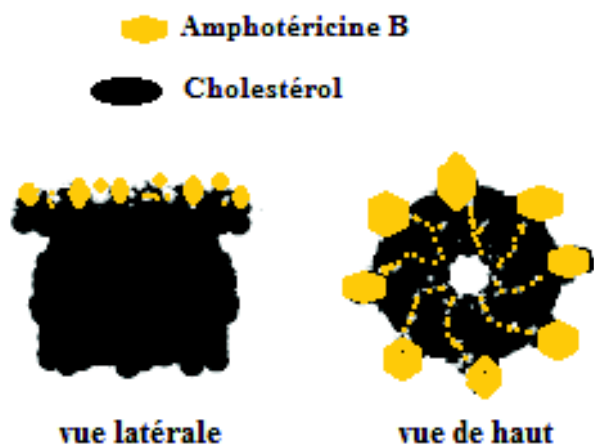


Figure 3 : Interaction Amphotéricine B-cholestérol sur un pore membranaire (Khutorsky, 1996)

L'AmB, a une action préférentielle sur les champignons de par sa fixation à un stérol contenu dans leurs membranes, l'ergostérol, plutôt qu'au cholestérol membranaire humain (Figure 4). Cela crée ainsi un canal transmembranaire duquel résulte une rupture de l'intégrité de la membrane et par conséquent une plus grande perméabilité. Ce phénomène induit alors une fuite des composants intracellulaires et la mort de la cellule par lyse membranaire. Ainsi, tous les organismes sensibles aux polyènes, l'AmB en particulier, contiennent des stérols dans leur membrane externe. Du fait de l'analogie structurelle entre ergostérol et cholestérol, des effets indésirables chez l'homme sont néanmoins provoqués par la fixation de l'AmB au cholestérol membranaire humain. La résistance des champignons est fondée sur un changement et un appauvrissement de leur membrane en stérols spécifiques (17).

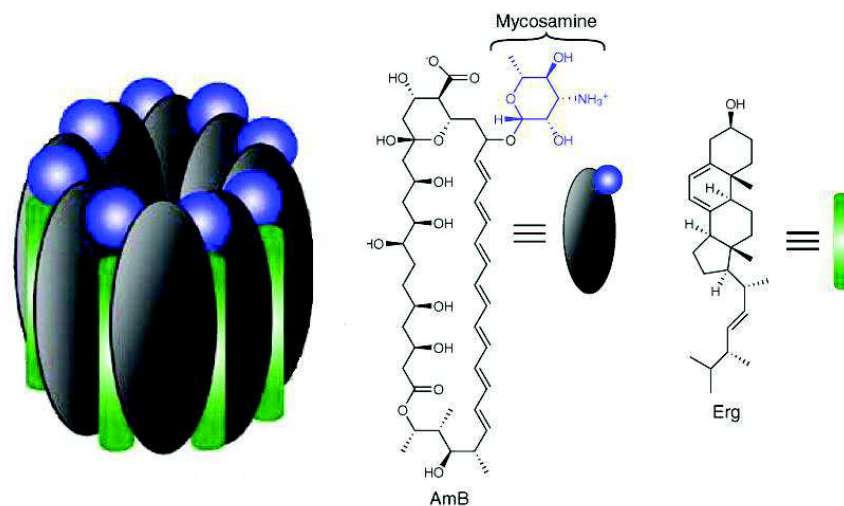


Figure 4 : Interaction de l'AmB avec l'ergostérol de la cellule fongique (selon Burke et al. 2004)

Principales Indications

Depuis une cinquantaine d'années, l'AmB est l'antibiotique le plus efficace pour le traitement de différentes infections fongiques, de mycoses profondes viscérales ou systémiques causées par les espèces *Leishmania*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Scedosporium* (5). C'est ainsi le traitement de référence pour combattre les infections fongiques invasives touchant majoritairement les personnes immunodépressives sévères et pour prévenir les infections nosocomiales lors d'interventions chirurgicales lourdes telles que les transplantations d'organes (19).

II. Leishmaniose et les infections fongiques

Leishmaniose

C'est une maladie parasitaire causée par les parasites *Leishmania* et transmise par les piqûres d'insectes phlébotomes. Ce parasite protozoaire compte plus de 20 espèces différentes selon les régions. La pauvreté et les régimes alimentaires appauvris en protéines et en zinc sont des facteurs de haut risque pour le développement de la pathologie (20).

Selon l'OMS, il y existe chaque année entre 700000 et un million de nouveaux cas qui provoquent entre 20000 et 30 000 décès.

On distingue trois formes cliniques pour cette affection: la leishmaniose cutanée, la leishmaniose cutanéomuqueuse et la leishmaniose viscérale. Cette dernière représente la forme pathologique la plus redoutable et une cause de mortalité en l'absence de traitement. Elle est aussi appelée la fièvre noire ou Kala-azar.

Leishmaniose cutanée

C'est la forme la moins dangereuse mais la plus fréquente, qui semble toucher un grand nombre de personnes vivant dans les régions d'Amérique du sud et du bassin méditerranéen. Elle est caractérisée par l'apparition de lésions cutanées et surtout d'ulcères, sources de cicatrices et d'handicaps. Selon l'OMS, il existe annuellement entre 600000 et un million de nouveaux cas dans le monde. La leishmaniose muco-cutanée est une autre forme, en majorité présente dans les pays tropicaux, qui attaque et détruit les muqueuses nasales et buccales(21).

Leishmaniose viscérale

C'est la forme la plus dangereuse et responsable d'un taux de mortalité important en cas d'absence de traitement. Cette maladie se développe principalement dans les tissus des macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse (20). Elle est fortement présente dans les régions chaudes et les plus pauvres du monde. En 2015, plus de 90% des cas étaient localisés au Brésil, Ethiopie, Inde, Kenya, Somalie et Soudan du sud. Si son incidence est grande dans ces pays surtout en Inde et au Bangladesh où elle est endémique, son développement prend aussi de l'ampleur dans les pays occidentaux parallèlement à l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés. Trois espèces parasitaires majeures sont impliquées : *Leishmania donovani* en Inde et au Bangladesh, *Leishmania infantum* en Europe et en Afrique, et *Leishmania chagasi* en Amérique.

Pendant les années 1990, les principaux traitements utilisés contre la forme viscérale étaient principalement les antimonymes pentavalents et la Pentamidine mais non dépourvus d'une certaine toxicité. L'AmB est considéré comme un des traitements actuels le plus efficace(22), notamment sous une forme liposomale avec la spécialité AmBisome®, qui présente une toxicité moindre mais qui reste d'un coût élevé (23). La spécialité Amphocil®, en plus de l'Ambisome®, a également montré son efficacité contre la forme cutanée (24).

l'Aspergillose pulmonaire

Parmi les 300 espèces d'*Aspergillus*, une dizaine de types de ces champignons comporte des risques pathogènes pour l'homme après inhalation. On peut citer *Aspergillus Niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* mais le plus répandu et le plus dangereux reste l'*Aspergillus Fumigatus* (Figure 5) (25). L'aspergillus est un champignon filamenteux omniprésent dans l'environnement et pouvant accéder à l'arbre trachéo-bronchique à travers les voies aériennes. En effet, la température et l'humidité présentes dans les poumons sont des facteurs favorables à la croissance et au développement des germes. Sa présence à ce niveau n'est pas forcément morbide. En particulier chez les sujets sains, l'escalator mucociliaire permet d'éliminer les spores d'aspergillus qui seront ensuite évacués principalement par les macrophages. Par contre, ce champignon peut avoir des conséquences plus ou moins graves chez les personnes atteintes de pathologies, selon leur profil immunitaire et leur âge (26).

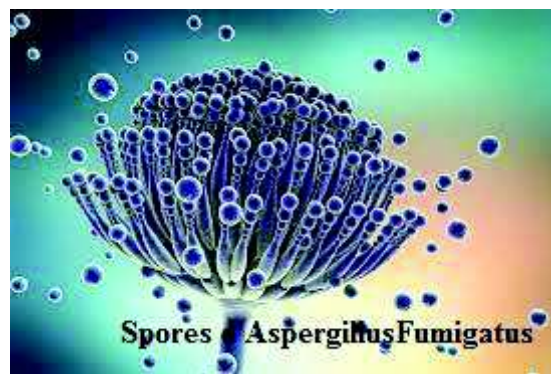


Figure 5 : Image par microscopie électronique du champignon Aspergillus Fumigatus

Les différents types d'aspergilloses pulmonaires

L'aspergillose est un terme qui regroupe les infections causées par des champignons appartenant au genre *Aspergillus*, dont les spores sont véhiculées par l'air et sont inhalées par tous les individus. Totalement inoffensif pour la majorité de la population, ces champignons peuvent cependant provoquer différentes formes de mycoses. L'espèce *Aspergillus*

fumigatus est responsable de plus de 80% des aspergilloses humaines. Les aspergilloses touchent principalement le système respiratoire et différents types sont répertoriés: l'aspergillome, l'aspergillome nécrosante chronique, l'aspergillose immuno-allergique (comme l'aspergillose bronchopulmonaire allergique) ainsi que l'aspergillose invasive pulmonaire(27).

L'aspergillome

C'est une forme d'aspergillose qui se traduit par la formation d'une boule « mycélienne » désignée sous le terme de truffe aspergillaire (Figure 6), composée de filaments et d'hyphes d'aspergillus d'un diamètre important pouvant atteindre jusqu'à 5 cm, qui colonise une partie du poumon. Le champignon peut se développer dans une cavité préexistante dans le poumon et résultant d'une maladie antérieure telle que la tuberculose ou la sarcoïdose(28)(29). La formation d'une aspergillome peut aussi découler d'une intervention chirurgicale thoracique à la suite d'une lobectomie pulmonaire, d'une pneumotomie, d'une bronchectasie, d'une dilatation des bronches ou d'un carcinome pulmonaire(34)(35). La maladie peut passer inaperçue, surtout dans les phases précoces. Perte de poids, toux chronique, fatigue, expectorations sanglantes (chez 50 à 80% des personnes infectées) signent les stades avancés de la mycose. Les hémoptysies (crachats de sang) sont un signe de mauvais pronostic et imposent habituellement la résection chirurgicale, quand celle-ci est possible, même si le taux de mortalité après l'intervention reste élevé, entre 15% et 23% (32). Dans certains cas, un traitement local antifongique peut être envisagé selon la taille des lésions et leur localisation.



Figure 6 : *Truffe Aspergillaire dans une cavité pulmonaire (33)*

Dans le cas d'une aspergillome asymptomatique, les traitements antifongiques à base d'itraconazole ou encore d'AmB par voie parentérale ont montré des résultats satisfaisants mais dépendants des patients (37) (38). Ces traitements peuvent être administrés dans un cadre de soin palliatif où l'on peut préconiser l'utilisation d'une pâte composée de

triglycérides et d'AmB par injection cavitaire (36) ou encore l'utilisation de l'itraconazole à une dose élevée (200mg/jour pendant six mois).

L'aspergillome nécrosante chronique

L'Aspergillome nécrosante implique une invasion tissulaire avec une destruction du parenchyme pulmonaire. Cette forme se rapproche de l'aspergillose pulmonaire invasive tout en ayant une évolution beaucoup moins rapide. Elle est souvent associée à une immunosuppression de faible intensité (cachexie, diabète, etc...).

L'aspergillose bronchopulmonaire allergique

C'est une forme de maladie considérée comme une réaction d'hypersensibilité aux antigènes de spores qui atteignent le système respiratoire et qui provoquent une aspergillose pulmonaire chronique. Les personnes les plus exposées à ce type d'allergie sont les asthmatiques chroniques ou encore les patients atteints de mucoviscidose. (37). Dans une étude clinique, l'utilisation de l'AmB(désoxycholate AmB) sous forme inhalée sur des patients atteints d'une mucoviscidose a montré une nette amélioration de leurs états(38).

De manière générale, les traitements préconisés contre l'aspergillose pulmonaire sont divisés en trois principales familles : Les polyènes (Amphotéricine B, Nystatine), les triazolés (Voriconazole, Itraconazole) et enfin les échinocandines (Capsfungine)(27,39).

L'aspergillose pulmonaire invasive

L'aspergillose invasive est la forme clinique la plus dangereuse qui représente la seconde cause de mortalité par infection fongique à l'hôpital. Cette pathologie touche principalement les sujets immunodéprimés, en particulier les patients qui ont subi une greffe de moelle, les patients soumis à un traitement anticancéreux et neutropénique de manière prolongée, à un traitement immunosuppresseur à la suite d'une greffe d'organe, les patients atteints du sida à un stade avancé, et plus rarement les patients hospitalisés en réanimation(2).Les symptômes sont fièvre, toux, douleurs thoraciques et difficultés respiratoires.

Chez ces sujets présentant un système immunitaire défaillant, les spores fongiques vont s'installer progressivement dans les poumons. Une fois développés, les hyphes continueront à coloniser les tissus pulmonaires. A long terme, le champignon se propage au niveau des reins, du foie, du cœur et peut même atteindre le cerveau. Le taux de survie dans ces cas d'atteinte avancée est très faible et reste inférieure à 10% malgré les traitements mis en place(40,41).

Le diagnostic de l'Aspergillose pulmonaire invasive est très difficile à poser dans les stades précoces de la maladie d'où l'intérêt de l'utilisation d'une technique à haute résolution : la tomographie assistée par ordinateur (TDM) pour visualiser le signe « halo » ainsi que les lésions appelées l'infarctus hémorragique (Figure 7). Ces signes caractéristiques de la pathologie sont présents dans presque 80% des cas et ressemblent à un cas d'infarctus avec des lésions suite à l'obstruction de la veine de drainage des tissus pulmonaires (42).

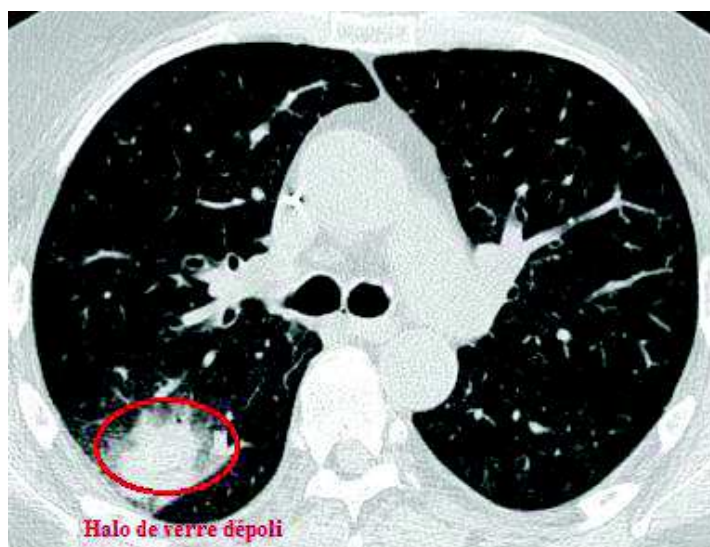


Figure 7 : Représentation d'un lobe pulmonaire montrant un signe Halo (43)

L'utilisation de la spécialité Abelcet® sous forme inhalée a montré des résultats encourageants avec une bonne distribution pulmonaire dans les cas de prophylaxie de l'aspergillose pulmonaire invasive chez les patients subissant une transplantation d'organes. (43). Une étude réalisée dans 24 centres médicaux sur un ensemble de patients atteints de l'aspergillose pulmonaire invasive a montré que seuls 38% des patients sont restés en vie trois mois après. La dangerosité de cette forme d'aspergillose montre la limite des traitements actuels proposés et nécessiterait la mise en place de traitements plus performants (2).

Formes médicamenteuses commercialisées à base d'AmB

Du fait de la faible absorption intestinale de la molécule d'AmB, les traitements médicamenteux à base de cet antifongique actuellement disponibles sur le marché sont destinés principalement à une administration par voie intraveineuse. L'AmB injectable est

disponible sous trois formulations différentes en France : une forme non lipidique (Fungizone®), une forme liposomale (AmBisome®) et une forme lipidique (Abelcet®).

- La **Fungizone®** fut le premier médicament commercialisé. Découvert dans les années cinquante, il se présente sous forme d'une dispersion d'AmB avec le désoxycholate de sodium comme solubilisant.
- L'**AmBisome®** se présente sous forme de petits liposomes unilamellaires (Small Unilamellar Vesicles : SUV) d'une taille entre 60-80nm, composés de phospholipides de soja, de distéaroyl-phosphatidylglycérol (DSPG) et de cholestérol, contenant 10% d'AmB.
- L'**Abelcet®** est une forme lipidique à base de deux phospholipides synthétiques - dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) et dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) dans un rapport molaire de 7 à 3 avec une quantité équimolaire d'AmB. Ces composants sont assemblés en forme de rubans d'une longueur de 1 à 10 micromètres.
- La spécialité **Amphocil®** commercialisée en Europe et la spécialité **Amphotec®** commercialisée aux États-Unis se présentent sous forme de complexes entre le sulfate de cholesteryl et l'AmB dans des proportions équimolaires. Ceux-ci ont la forme de disques minces d'environ 120 nm de diamètre.

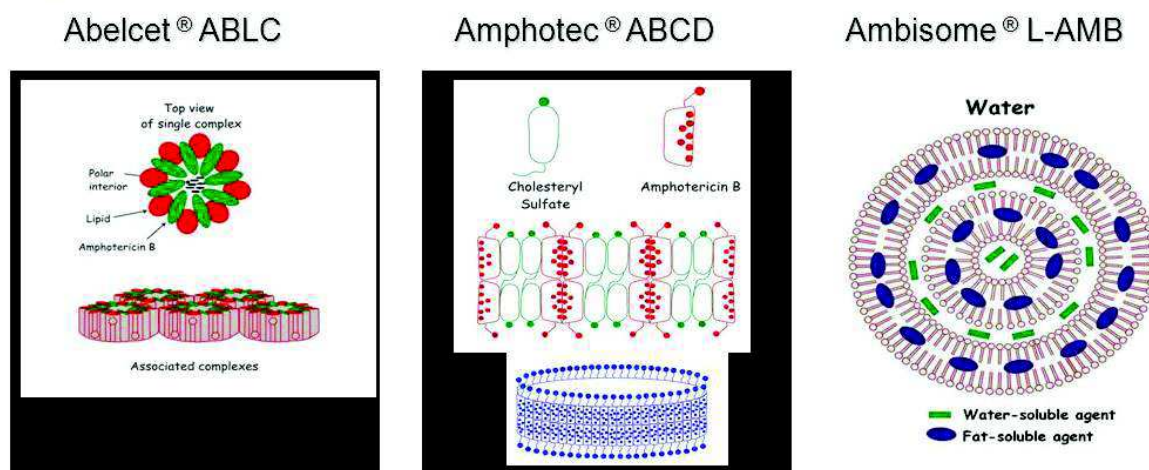


Figure 8 : les différentes formes d'amphotéricine B commercialisées(44)

Limites et inconvénients des traitements actuels

Le temps de demi-vie des formes lipidiques Abelcet® et Amphotec® dans le torrent circulatoire est beaucoup plus court comparativement à la forme liposomale Ambisome® du

fait d'une captation plus rapide par le système réticulo-endothélial avec pour conséquence leur élimination accélérée par les cellules phagocytaires (23).

Les spécialités Ambisome® et Abelcet® disponibles en France sont des médicaments efficaces pour le traitement des infections fongiques mais leur administration réservée à la voie parentérale, leur toxicité dose-dépendante et leur coût onéreux restent contraignants (14).

En effet, seule la voie intraveineuse est possible pour l'administration des traitements à base d'AmB, ce qui nécessite une prise en charge post-perfusion du fait de la toxicité aiguë de la molécule médicamenteuse. La nécessité d'administration de fortes doses pour certaines pathologies infectieuses reste l'un des problèmes majeurs car responsable d'une néphrotoxicité aiguë chez les patients (45,46). De nombreux effets indésirables sont également constatés après perfusion de l'AmB tels que des vomissements et des diarrhées ainsi qu'une toxicité chronique comme une fièvre, des maux de tête, des rougeurs cutanées, des douleurs musculo-squelettiques et des tachycardies. Ces réactions sont principalement dues à la production de cytokines pro-inflammatoires à partir des cellules immunitaires innées (47,48). L'anémie est aussi un des effets secondaires les plus répandus chez les patients car présente dans 75% des cas (48).

En dépit de ces problèmes majeurs, la perfusion intraveineuse reste la seule voie d'administration possible compte-tenu des paramètres physico-chimiques limitants de l'AmB comme sa très faible solubilité aqueuse ainsi que sa faible perméabilité à travers l'épithélium de la barrière gastro-intestinale. Cette voie d'utilisation nécessite une hospitalisation avec pour conséquence une augmentation de la prise en charge financière des soins du patient s'ajoutant aux frais du traitement. En effet, L'AmBisome® reste la forme pharmaceutique qui présente le moins d'effets toxiques pour le traitement de l'aspergillose pulmonaire invasive, mais l'évaluation du coût du traitement s'avère onéreux car estimé à environ 60000 euros pour une durée de trois mois, le coût revient d'un flacon dosé à 50mg étant de 60 euros avec une dose posologique optimale de l'ordre de [3-5] mg/kg/jour. (8).

Dans le tableau suivant sont résumés les posologies et le mode d'administration des spécialités injectables à base d'AmB selon les recommandations de L'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des produits de santé (ANSM, 2018).

Tableau 1 : Liste des spécialités injectables à base d'Amphotéricine B- Tableau comparatif des Résumés Caractéristiques du Produit (RCP) (ANSM, 2018)

Spécialité	Abelcet® Suspension à diluer pour perfusion Complexe phospholipidique d'amphotéricine B	AmBisome® Poudre pour suspension de liposomes pour perfusion Amphotéricine B liposomale	Fungizone® Poudre pour solution injectable Amphotéricine B desoxycholate
Posologie et mode d'administration	<ul style="list-style-type: none"> • La dose recommandée est de 5 mg/kg/jour pendant 14 à 21 jours. • Abelcet® doit être administré par perfusion intraveineuse à un débit de 2,5 mg/kg/heure. 	<ul style="list-style-type: none"> • La dose recommandée est de 3 mg/kg/jour (sauf pour les leishmanioses viscérales pour lesquelles la dose cumulative recommandée est de 18-24 mg/kg en 6 perfusions). • AmBisome® doit être administré en perfusion intraveineuse stricte de 30 à 60 minutes. Si le patient ressent une gêne au cours de cette perfusion, la durée de la perfusion peut être prolongée. 	<ul style="list-style-type: none"> • La dose recommandée est de 0,3 mg/kg administrée en 2 à 6 heures. <p>Ce médicament devra être administré en perfusion intraveineuse lente (environ 2 à 6 heures). La concentration pour la perfusion intraveineuse ne doit pas dépasser 0,1 mg/ml (1 mg/10 ml).</p> <ul style="list-style-type: none"> • En aucun cas, la dose totale journalière ne doit excéder 1,5 mg/kg.
Modalités de reconstitution et de dilution	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de reconstitution. • Dilution avec du soluté glucosé à 5% pour obtenir un volume final de perfusion d'environ 500 ml (concentration de 0,2 mg/ml). 	<ul style="list-style-type: none"> • Reconstitution du flacon de 50 mg avec 12 ml d'eau PPI (4 mg/ml). • Utilisation d'un filtre de 5 µm lors de la dilution. • Dilution avec une solution injectable de glucose (à 5%, 10% ou 20%), pour obtenir une concentration finale comprise entre 0,20 mg/ml à 2 mg/ml. 	<ul style="list-style-type: none"> • Reconstitution du flacon de 50 mg avec 10 ml d'eau PPI (5 mg/ml). • Dilution avec 500 ml de sérum glucosé à 5% pour une concentration finale de 0,1 mg/ml. La concentration pour la perfusion intraveineuse ne doit pas dépasser 0,1 mg/ml.

Des travaux de recherche sont de plus en plus développés pour viser l'amélioration des propriétés antifongique et anti-leishmaniosede l'AmB, et surtout pour proposer d'autres voies possibles d'administration que la voie parentérale pour permettre de diminuer les effets néphrotoxiques.

III. La vectorisation

Un médicament produit une réponse pharmacologique spécifique s'il atteint son site d'action. Ce concept est à l'origine des recherches ayant pour but de développer de nouveaux systèmes galéniques capables de vectoriser des médicaments. La *vectorisation* ou *ciblage* de médicaments (« *drug targeting* ») vise alors au moyen d'un support vecteur adapté, le transport vers des sites d'action spécifiques au niveau d'un organe (vecteurs 1ère génération : microsphères et microcapsules), d'un tissu (vecteurs 2ème génération : liposomes, nanosphères et nanocapsules) ou d'une cellule (vecteurs 3ème génération : liposomes, nanoparticules pilotés par des lectines, des anticorps monoclonaux, ...)(49). Dans le cas des vecteurs de seconde génération, une dissociation entre les systèmes de ciblage passif ou actif peut être faite.

- La vectorisation passive utilise les phénomènes physiologiques de distribution des particules chargées en médicament une fois administrées dans le compartiment

vasculaire. Des particules entre 0,1 et 1 μm de diamètre peuvent être rapidement éliminées de la circulation sanguine, après administration intraveineuse, intra-artérielle ou intrapéritonéale, après endocytose par des cellules du système réticulo-endothélial (S.R.E.) ou des leucocytes polynucléaires.

- La vectorisation active, en utilisant des systèmes de reconnaissance spécifique pour modifier la distribution, a recours à des anticorps monoclonaux, à la fixation en surface des particules colloïdales de ligands cellulaires spécifiques ou encore à la modification des particules en surface de façon à supprimer l'opsonisation et la phagocytose par le S.R.E. Des vecteurs colloïdaux ainsi guidés vers certains organes et tissus permettent d'envisager une thérapeutique intracellulaire.

On peut ainsi dégager des potentialités d'applications des vecteurs :

- Protection contre l'inactivation (chimique, enzymatique ou immunologique) des molécules médicamenteuses entre le site d'absorption et celui où se développe l'action pharmacologique.
 - Amélioration du transport des substances actives jusqu'à certains sites difficiles à atteindre (cas des affections bactériennes ou parasitaires localisées dans des territoires extra ou intracellulaires inaccessibles par simple diffusion ou pour traverser par exemple la barrière hématoencéphalique (BHE)).
 - Accroissement de la spécificité d'action par concentration sélective, efficace et régulière des principes actifs au niveau de la cible cellulaire. Ainsi avec des doses plus faibles, l'activité thérapeutique est au moins identique et les effets secondaires diminués.
- Les microparticules sont des particules sphériques dont la taille varie en moyenne entre 1 et 1300 μm . La structure d'une microparticule est conditionnée par le procédé de fabrication utilisé, le chargement en principe actif et la solubilité de la substance médicamenteuse dans le polymère. On distingue deux catégories de microparticules :

- Les microsphères sont des particules de type matriciel, constituées d'un réseau continu de matériau polymère dans lequel la substance à encapsuler est dispersée à l'état moléculaire.
- Les microcapsules sont des particules de type vésiculaire, constituées d'une enveloppe de nature polymérique et d'un noyau de nature lipophile.

- Les nanoparticules sont des vésicules sphériques solides, de taille submicronique puisque leur diamètre varie de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. Le matériau constitutif de ces particules est un polymère, macromolécule d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique. On distingue les nanosphères de type matriciel et les nanocapsules de type vésiculaire dont le noyau central est de nature lipophile comme pour les microcapsules (Figure 9).

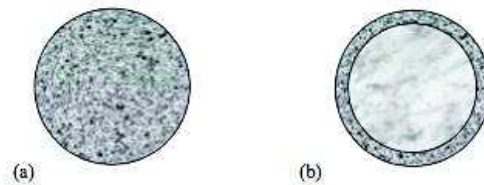


Figure 9 : Représentation schématique des nanoparticules
 (a) Nanosphère (b) Nanocapsule
 (Legrand et al, 2007, Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique)

- Les liposomes sont des vésicules sphériques dont le centre est occupé par une cavité aqueuse et dont l'enveloppe est constituée par un nombre variable de feuillets moléculaires à base de phospholipides (Figure 10). Les lipides utilisés sont principalement des glycéro-phospholipides, des sphingolipides et/ou du cholestérol. Les molécules actives hydrosolubles seront incorporées préférentiellement dans la phase interne aqueuse des liposomes, les molécules actives amphiphiles seront insérées dans la bicouche phospholipidique et celles liposolubles dans la matrice hydrophobe de la paroi liposomale.

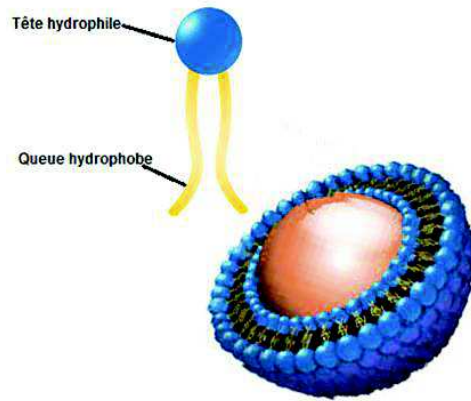


Figure 10 : Structure d'un liposome

Les méthodes de préparation des liposomes sont nombreuses et peuvent aboutir à la formation de plusieurs types de vésicules différents par leur taille, leur structure et leur capacité d'encapsulation (Figure 11). :

- liposomes unilamellaires :
 - Small Unilamellar Vesicles* ou SUV avec une taille de l'ordre de 20 à 100 nm
 - Large Unilamellar Vesicles* ou LUV avec une taille de l'ordre de 100 à 1000 nm
- liposomes multilamellaires : *Multilamellar Vesicles* ou MLV avec une taille très hétérogène.

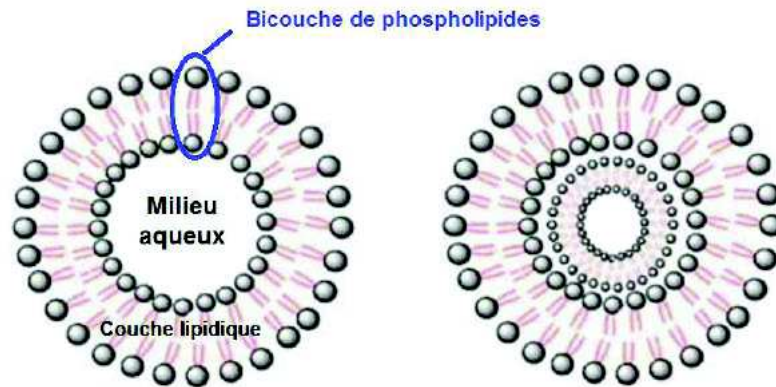


Figure 11 : Structures des liposomes unilamellaires (SUV/LUV) et multilamellaires (MLV)

Les diverses formes d'Amphotéricine B

Différents travaux ont permis une avancée majeure pour l'utilisation de l'AmB en tant que molécule médicamenteuse destinée au traitement de différentes infections fongiques.

De nombreux travaux ont déjà prouvé l'intérêt thérapeutique des liposomes pour le traitement de diverses pathologies comme l'histoplasmosse murine (Taylor et al, 1988), la cryptococcose (Graybill et al. 1982) ou encore la candidose (Lopez-Berestein et al.,1983). Lopez-Berestein *et al.* ont été parmi les premiers à développer des structures liposomales conduisant à une meilleure efficacité ainsi qu'à une diminution de la toxicité par rapport au traitement conventionnel avec l'AmB (50). C'est en 1998 que le premier médicament d'AmB, élaboré sous forme de liposomes, sera commercialisé sous le nom Ambisome® (51,52). Cette spécialité pharmaceutique se présente sous forme de vésicules unilamellaires (LUV) constituées de phosphatidylcholine, de phosphatidyl di-glycérol, de cholestérol et de tocophérol.

La forme liposomale présente un meilleur index thérapeutique (53–55) et permet une plus grande tolérance chez les patients cancéreux atteints d'infections fongiques. Les liposomes peuvent être administrés en grandes quantités par voie parentérale sous forme de perfusion afin d'atteindre des concentrations systémiques efficaces (50). Ils permettent de limiter la toxicité rénale et d'obtenir une meilleure libération ciblée comparativement à une suspension d'AmB deoxycholate (spécialité Fungizone®) (52,55,80). D'autres types de vésicules à base d'AmB ont également été développés dans le but de prévenir des effets secondaires importants, ce qui a donné lieu à une grande variété de formulations à usage parentéral (56–58) comme des structures lipidiques (Abelcet®) (11,12) ou des dispersions colloïdales (60,61). Les formulations lipidiques semblent aussi bien adaptées pour le traitement de la leishmaniose viscérale ou cutanée pour le traitement des infections fongiques invasives suspectées (62).

De nombreux autres travaux font référence au développement de systèmes divers ou à des formes vectorisées autres que des liposomes pour améliorer les traitements à base d'AmB.

Ainsi, des nano-émulsions à base de polyéthylène-glycol 400 (PEG400) et de surfactants (propylène-glycol monocaprylate et Labrasol) ont été mises au point pour améliorer la solubilisation de l'AmB. Une administration topique de cette formulation a induit une meilleure pénétration membranaire et une déposition au niveau des cellules fongiques multipliée par un facteur 1,64 par rapport à la spécialité Fungisone® (63).

Des complexes d'AmB dans la poly-vinyl-pirrolidone (PVP) ont également prouvé leur efficacité vis à vis du champignon *aspergillus spp* avec une réduction des effets cytotoxique et hémolytique comparativement à la spécialité Fungizone[®], mais l'inconvénient majeur de cette formulation est la nécessité d'utiliser des quantités importantes de polymère PVP pour solubiliser la substance active (64).

Des microsphères d'AmB dans le complexe chitosan-EDTA ont été développées par spray-drying et ont permis d'obtenir un taux élevé de la forme monomérique équivalent à la Fungizone[®] (7).

Le développement de nanosphères à base de polymère biodégradable (poly epsilon-caprolactone) associé au copolymère poloxamer 188 ont montré une efficacité comparable au médicament Fungizone[®] pour traiter l'aspergillose pulmonaire invasive à la dose de 10mg/kg comparativement à une dose de 4mg/kg pour la spécialité pharmaceutique (65).

Des nanosphères conçues par un procédé de lyophilisation à base de composés lipidiques (lécithine et huile de soja) avec un diamètre moyen compris entre 25-50nm, ont montré une meilleure efficacité que l'Ambisome[®] et la Fungizone[®] vis-à-vis de l'aspergillose pulmonaire invasive. Ces nanosphères administrées par voie intraveineuse à des rats à des doses de 3mg/kg/jour conduisent à un taux de survie de 100% (66).

Comme alternative à la voie parentérale, diverses formes galéniques ont aussi été mises au point pour administrer l'AmB par voie orale.

L'étude du comportement des liposomes d'AmB a été étudiée dans le milieu gastro-intestinal, dans l'estomac ou le duodénum. Une méthode élaborée par Nagata et al. (67) permet de mesurer les quantités d'AmB présentes en fonction du temps et d'estimer ainsi le flux et la cinétique de libération de la molécule active.

Même si l'administration par voie orale n'est pas utilisée en première intention du fait de problèmes de perméabilité et d'absorption liés aux caractéristiques physico-chimiques de l'AmB, elle reste la voie la plus simple d'utilisation et bien moins onéreuse que la voie intraveineuse (68). De ce fait, de nombreuses études font référence au développement de formulations adaptées à la voie orale. C'est par exemple, le cas d'un mélange associant l'AmB à la miltéfosine, un alkyl-lysophospholipide analogue synthétique de 2-

lysophosphatidylcholine, qui a permis d'augmenter l'efficacité de la forme monomérique du polyène contre la leishmaniose. Une évaluation *ex-vivo* de l'absorption gastro-intestinale effectuée sur une culture de cellules de la lignée intestinale humaine de type Caco-2, a montré une bonne perméabilité intestinale de l'AmB, confirmée par une biodisponibilité élevée (69).

Des systèmes nanoparticulaires à base de polymères PLGA ou poly(lactic-co-glycolic acid) ont permis de vectoriser l'AmB par voie orale pour agir avec efficacité contre *Leishmania Donovanii* dans le cadre du traitement de la leishmaniose viscérale (70,71).

En dépit de nombreux travaux de recherche (53,72–75) pour prouver l'intérêt d'une administration de l'AmB sous forme d'aérosol par voie pulmonaire, autre voie alternative à la voie parentérale, aucun médicament n'est à ce jour commercialisé et le défi d'utiliser cette approche non invasive pour une délivrance locale ou systémique reste donc à relever (76,77).

Des liposomes d'AmB ont ainsi été développés dans l'optique d'être inhalés en prophylaxie de l'aspergillose pulmonaire invasive (API) chez des personnes atteintes de neutropénie et très exposées au risque aspergillaire du fait de leur immunité diminuée. Une étude clinique a montré que seuls 4% des 139 patients traités par des liposomes d'AmB nébulisés à des doses de 5mg/mL ont développé une API contre 14% des patients ayant pris le placebo (73).

Par comparaison à l'AmB désoxycholate, les liposomes montrent également un avantage pour freiner la diffusion du champignon au niveau des poumons pour le traitement de l'API (78) sans aucune modification au niveau pulmonaire contrairement à l'AmB, bien connu pour son effet toxique sur le fluide pulmonaire avec une incidence sur les facultés respiratoires (73).

Par ailleurs, d'autres antifongiques que l'AmB comme l'itraconazole, formulés sous forme de dispersions solides et administrés par inhalation, ont démontré une action locale satisfaisante (74).

Une préparation médicamenteuse d'AmB sous forme d'aérosol sec pourrait donc permettre d'atteindre les alvéolaires pulmonaires afin d'éradiquer de manière efficace les spores d'*Aspergillus* implantés dans l'arbre pulmonaire en s'affranchissant d'une distribution de la molécule active vers d'autres organes via le torrent circulatoire.

IV. La voie pulmonaire et la thérapie par inhalation

La voie pulmonaire est une voie d'administration alternative à la voie parentérale et à la voie orale, adaptée pour délivrer des substances actives insolubles ou peu solubles en milieu physiologique. D'un point de vue historique, les anciennes civilisations font déjà référence à la pratique de l'inhalation comme moyen thérapeutique pour le traitement des maladies pulmonaires. A titre d'exemple, pendant la période de la Chine antique vers 2600 avant J.C, l'administration pulmonaire de substances actives est déjà décrite dans la Pharmacopée Chinoise. En Inde, l'inhalation d'un mélange d'herbes sous forme de vapeurs pour traiter les infections pulmonaires remonte à des temps très anciens. L'inhalation était aussi une pratique ancestrale chez les peuples latino-américains qui utilisaient déjà les fumées du tabac pour un usage antalgique (79).

Le premier inhalateur de poudre sèche a été élaboré par l'américain Newton en 1864. Les essais préliminaires effectués par des spécialistes français dans les années 1940 avec l'appareil inhalateur de Newton consistaient à administrer une poudre sèche, transmise dans les poumons des patients à travers la bouche à l'aide d'un générateur muni d'une manivelle(79).

Biancani *et al.*(80) ont démontré qu'à partir de ce système d'inhalation, les molécules actives pouvaient être délivrées au niveau pulmonaire et atteindre la circulation sanguine via un passage trans-alvéolaire. Ces avancées notoires ont abouti à la mise sur le marché du premier inhalateur à poudre sèche en 1948 par les laboratoires américains Abbott sous la marque AEROHALOR®, adapté pour administrer des antibiotiques comme la pénicilline afin de traiter les infections pulmonaires (Figure 10) (81).



Figure 10: Inhalateur de poudre sèche AEROHALOR® des Laboratoires Abbott
(www.inhalatorium.com)

De nos jours, le large panel de dispositifs performants conçus pour permettre l'inhalation de substances médicamenteuses sous forme de préparations liquides ou de poudres sèches constitue une avancée notoire (inhalateurs à valve doseuse, inhalateurs de poudre sèche et nébuliseurs).

Composition du fluide pulmonaire

Le composant majeur du fluide pulmonaire est le surfactant pulmonaire, un matériau complexe tensioactif sécrété continuellement dans la lumière alvéolaire par les pneumocytes de type 2. Il est constitué d'un grand nombre de molécules différentes : lipides, phospholipides et protéines. Le surfactant pulmonaire est indispensable à une fonction respiratoire normale. Son rôle principal est de réduire la tension superficielle air/liquide créée par la fine couche de liquide se trouvant à la surface des alvéoles pulmonaires. La réduction de la tension superficielle facilite l'expansion des alvéoles à l'inspiration et les maintient ouvertes pendant l'expiration. Le déficit en surfactant est la cause de la maladie des membranes hyalines du nouveau-né prématuré, et participe aussi au syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte.

Le surfactant comporte environ 90 % de lipides et 10 % de protéines. Le composant principal est un phospholipide, la dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC) dont les acides gras (acide palmitique) sont saturés. La DPPC comporte un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe, ce qui lui permet de s'étaler à la surface alvéolaire, le pôle hydrophile vers la couche de liquide, le pôle hydrophobe vers l'air. Il en résulte la formation d'un film superficiel qui revêt toute la surface alvéolaire. Il existe aussi d'autres formes moins abondantes de phosphatidylcholines saturées. Un autre phospholipide, le phosphatidylglycérol (PG), est relativement abondant (jusqu'à 10 %) et totalement spécifique du surfactant. Celui-ci comporte aussi quelques autres phospholipides mineurs et des lipides neutres, notamment du cholestérol. Quatre protéines caractéristiques désignées *surfactant proteins A, B, C et D*, (SP-A, -B, -C et -D) sont présentes en faible quantité, mais jouent des rôles essentiels. Les protéines A et D sont de grande taille, hydrophiles, et ont des fonctions multiples, notamment dans les mécanismes anti-microbiens. Elles comportent en effet des sites de reconnaissance des chaînes glucidiques de surface des micro-organismes (*carbohydrate-recognition domains*) leur permettant de les agréger et de les présenter aux macrophages alvéolaires (opsonisation facilitant la phagocytose). Les protéines B et C sont de petites tailles, très hydrophobes et étroitement

associées aux phospholipides dont elles facilitent l'étalement. Elles interviennent aussi dans le métabolisme intra- et extracellulaire et le recyclage du surfactant (82).

Mécanismes de déposition des particules solides inhalées dans les poumons

La déposition des particules au niveau des poumons se fait principalement en fonction de la taille des particules inhalées et de leurs propriétés, suivant trois mécanismes(83)(Figure 11) :

L'impaction inertielle

L'impaction dépend de la masse et de la vitesse des particules, se déroulant dans le tractus respiratoire supérieur. Les particules, ne pouvant suivre les changements brusques de direction du flux d'air, se déposent au niveau de la paroi bronchique. Ce mécanisme sera prépondérant surtout pour les plus grosses particules, celles dont le diamètre est supérieur ou égal à 10 μm .

La sédimentation

Ce mécanisme de sédimentation concerne surtout les voies périphériques au niveau desquelles le mouvement de l'air est pratiquement laminaire. Les particules de diamètre de 2 à 5 μm qui présentent une masse suffisante se déposent sous l'action de la force de gravité, pour autant que les durées de résidence au niveau des voies aériennes soient élevées.

La diffusion

Ce type de déposition est dû au mouvement brownien des particules de petite taille (< 5.0 μm) qui vont diffuser dans les bronchioles pour atteindre les alvéoles pulmonaires (Figure 12). On peut considérer que les particules inférieures à 0.5 μm sont exhalées lors de l'expiration.

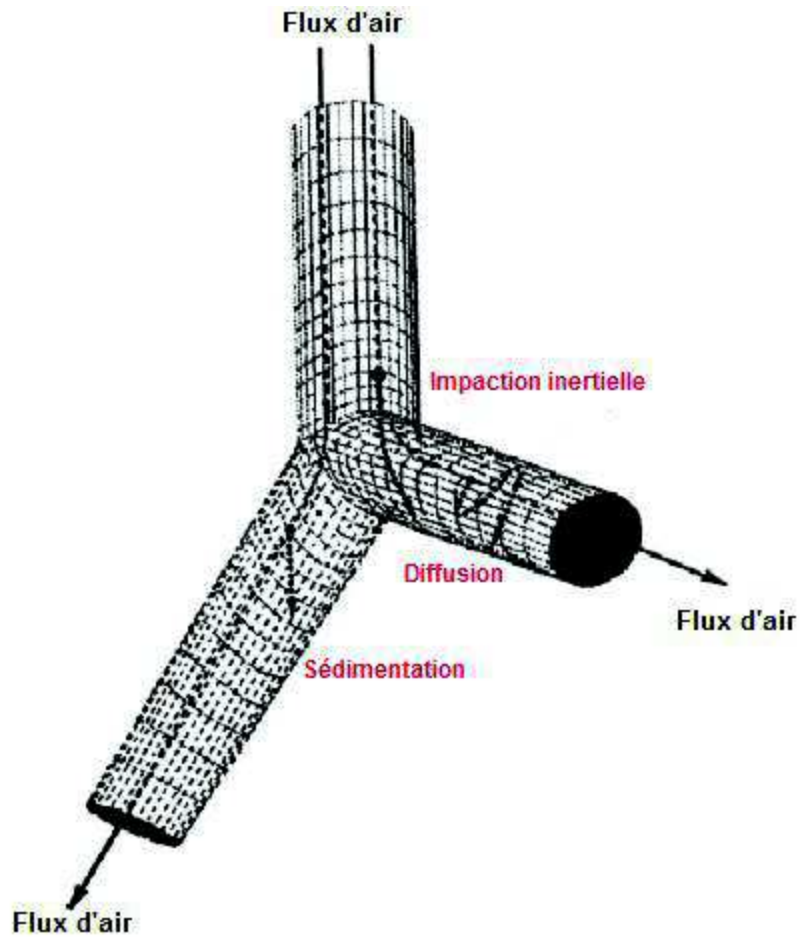


Figure 11 : Mécanismes de déposition pulmonaire des particules sèches inhalées(84)

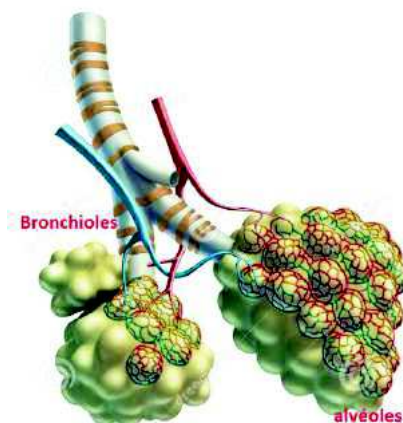


Figure 12 : Représentation des alvéoles pulmonaires (84)

Le devenir des particules médicamenteuses administrées par voie pulmonaire est schématiquement représenté par la Figure 13. Une molécule active peut emprunter des passages différents dans l'arbre pulmonaire selon ses caractéristiques de solubilité. Une

molécule soluble peut se dissoudre dans le fluide pulmonaire et permettre un effet local, non sans exclure un risque d'irritation voire de toxicité au niveau de son site d'action. Une molécule active dissoute peut aussi être absorbée, passer dans la circulation générale et permettre un effet systémique. Elle subira ensuite une étape d'élimination principalement par les reins après métabolisation, non sans exclure là encore un risque de néphrotoxicité. Les molécules solubles ou insolubles peuvent avoir une action locale spécifique mais une molécule insoluble sera plus facilement éliminée soit après un passage gastro-intestinal, soit par expectoration après un passage au niveau du pharynx.

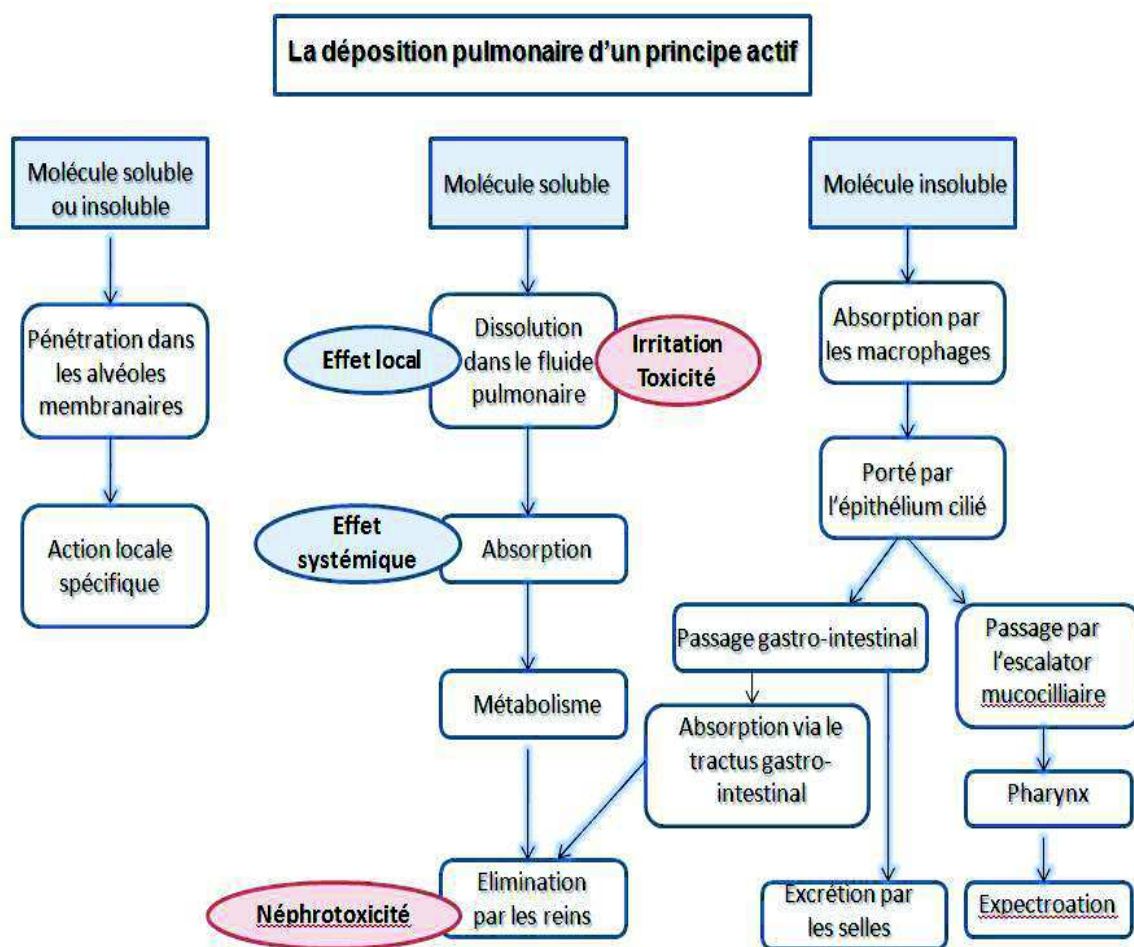


Figure 13 : Schéma du devenir des principes actifs après une administration pulmonaire par inhalation

Le schéma suivant (Figure 14) illustre le mécanisme de passage des particules dans les poumons ainsi que leur devenir à travers les différents systèmes de clairance pulmonaire.

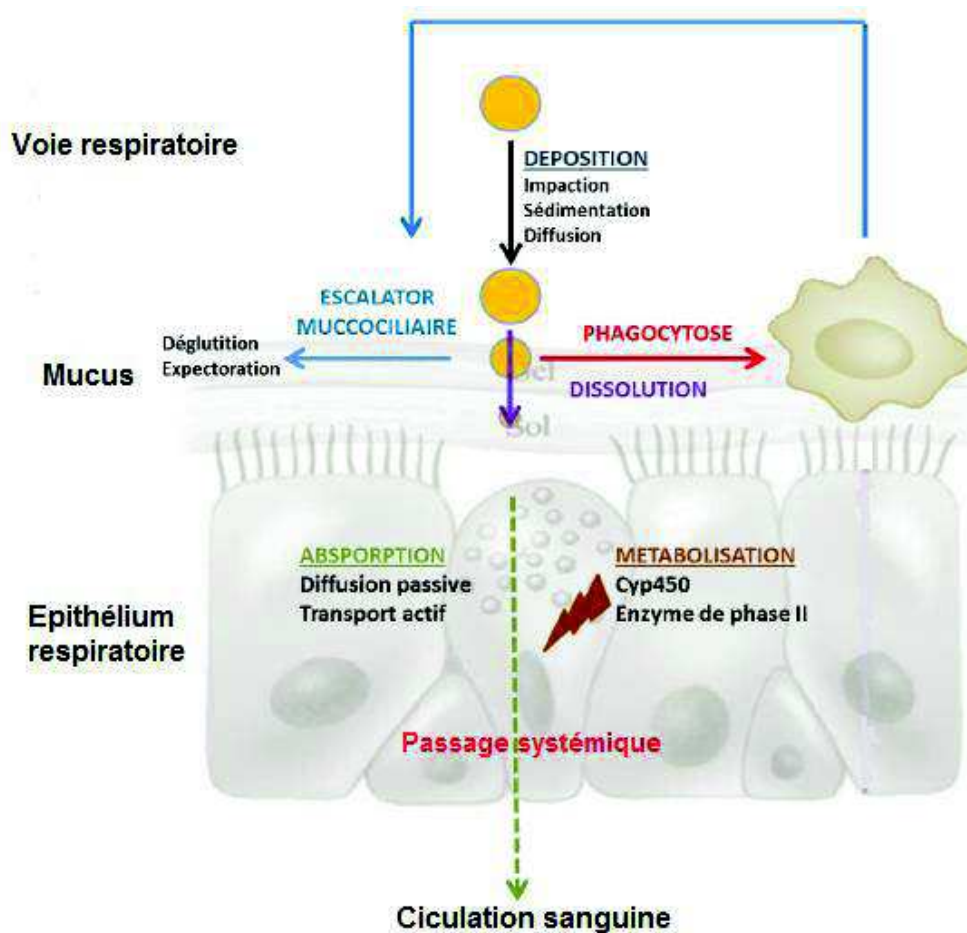


Figure 14: Les systèmes de clairance pulmonaire après déposition des particules par inhalation(33)

Intérêt de la voie pulmonaire

L'utilisation de la voie pulmonaire présente de nombreux avantages (81,85) tant pour l'obtention d'un effet local que d'un effet systémique:

Pour un effet local, elle va permettre de :

- concentrer les doses administrées au niveau du poumon
- diminuer les doses administrées
- diminuer les effets secondaires
- garantir un effet rapide non invasif
- garantir une concentration minimale inhibitrice (CMI)
- diminuer l'exposition systémique
- diminuer les interactions médicamenteuses lors d'une polythérapie

Pour un effet systémique :

- la surface alvéolaire représente une large surface d'absorption d'environ 140 m²,
- l'effet de premier passage hépatique est évité,
- la voie est non invasive et favorise donc la compliance et le confort des patients.

Le poumon présente une importante surface spécifique ainsi qu'une grande perméabilité membranaire (86). La délivrance pulmonaire locale se caractérise par un dépôt du principe actif au niveau de la zone de conduction (bronches et bronchioles). Elle est très utilisée pour traiter les maladies respiratoires comme l'asthme et les bronchopneumopathies (87). Par contre, la recherche d'un effet systémique nécessite une inhalation de la molécule médicamenteuse sous forme d'aérosol (très fines gouttelettes liquides ou très fines particules solides) avec un dépôt de la substance active au niveau de la zone profonde de l'arbre respiratoire, à savoir l'atteinte des alvéoles pulmonaires. L'évaluation du taux de pénétration d'un aérosol dans l'arbre bronchique dépend essentiellement du diamètre aérodynamique et du comportement des particules dans le flux d'air respiratoire, donc de la taille et de la densité des particules inhalées.

L'absorption systémique médicamenteuse par voie pulmonaire : quelles limites ? Quelles contraintes?

Sur le plan anatomique et morphologique, la membrane alvéolo-capillaire offre un site d'échange idéal entre le milieu extérieur et le compartiment sanguin (88) :

- une surface importante ;
- une grande finesse ($\leq 2 \mu\text{m}$) ;
- une vascularisation riche ;
- l'existence d'un faible équipement enzymatique (en particulier peu de peptidases) (89,90), avec une clairance mucociliaire quasi nulle (91) ;
- un accès facile, simple et physiologique.

Sur le plan ultra-structural, les différents éléments à franchir sont successivement (92) :

- le surfactant, couche phospholipidique dotée de propriétés tensio-actives tendant à faire obstacle à la dissolution des particules solides en raison de son pouvoir agrégeant ;

- le fluide superficiel, immédiatement sous-jacent dont la composition (riche en potassium, pauvre en protéines) est bien différente du mucus bronchique mais dont le rôle dans le devenir des molécules inhalées commence à peine à être connu ;
- l'épithélium alvéolaire, constitué d'une couche monocellulaire de cellules de type 1 larges et fines et de cellules de type 2 petites et compactes, à raison d'une centaine de cellules tapissant chaque alvéole. Plus de 90 % de l'obstacle au passage alvéolo-capillaire sont constitués par cet épithélium alvéolaire (93) ;
- la membrane basale, formée d'une fine matrice fibreuse extracellulaire dans le milieu interstitiel, qui se comporte comme un filtre rigide mais ne semble pas constituer un obstacle significatif au passage et à l'absorption des molécules ;
- l'endothélium vasculaire, composé d'une couche monocellulaire à l'origine des capillaires pulmonaires. Cette structure est considérée comme nettement plus perméable aux protéines que l'épithélium alvéolaire.

Les mécanismes intimes de l'absorption sont encore mal connus mais probablement de deux types (92) :

- la transcytose qui correspond au passage des molécules par inclusion intravésiculaire à travers les cellules épithéliales puis endothéliales par un mécanisme d'endocytose-exocytose, avec ou sans intervention d'un récepteur membranaire ;
- le passage paracellulaire qui s'opère dans les interstices situés à la jonction de deux ou trois cellules contiguës ou bien encore par les larges pores résultant transitoirement de l'altération ou de la mort d'une cellule épithéliale.

De multiples facteurs annexes jouent un rôle important dans la déposition alvéolaire optimale et l'absorption pulmonaire (94) principalement :

- la taille des particules (entre 1 et 3 μm de diamètre aérodynamique) et leur faible vitesse (inspiration lente et profonde avec un débit inspiratoire < 30 litres/minute) (95,96) surtout à haut volume pulmonaire en inspiration maximale (97) ;
- la taille et le poids moléculaire de la substance médicamenteuse. L'absorption pulmonaire est inversement proportionnelle à la masse moléculaire, avec une limite maximale aux alentours de 40 kDa;
- les caractéristiques physicochimiques de la molécule médicamenteuse notamment la lipophilie qui facilitent l'absorption ainsi qu'une charge électrique négative ;

- le tabagisme qui accroît très sensiblement la perméabilité de la membrane alvéolocapillaire aux substances médicamenteuses(98);
- les affections bronchopulmonaires aiguës intercurrentes ou surtout chroniques qui induisent des altérations inflammatoires des voies aériennes distales et des perturbations de la ventilation alvéolaire modifiant la qualité et la reproductibilité de l'absorption pulmonaire. C'est notamment le cas de la maladie asthmatique (99);
- un certain nombre d'agents promoteurs sont également susceptibles d'augmenter très sensiblement l'absorption pulmonaire des peptides et des protéines (100,101). C'est entre autres le cas du surfactant, des sels biliaires, des acides gras et des agents chélateurs. Ces substances ont malheureusement leur toxicité propre, notamment sur le long terme puisque leur mécanisme d'action passe par le biais d'une irritation tissulaire ou de perturbations de l'agencement et de l'architecture cellulaires (102).

Malgré ses limites et ses contraintes, la voie pulmonaire reste une voie très prometteuse notamment pour l'administration de molécules rapidement dégradées par voie orale comme les protéines et les peptides car très sensibles à l'activité protéolytique des enzymes digestifs et qui présentent une perméabilité très limitée à travers les muqueuses digestives.

L'administration de l'insuline par voie pulmonaire via une inhalation dans le cadre du traitement du diabète a fait l'objet de nombreux travaux de recherche (103) et a abouti à la mise sur le marché en 2006 du médicament Exubera® mais celui-ci a cependant fait l'objet d'un retrait de commercialisation un an après du fait d'effets indésirables graves (cancer des poumons).

La mise au point de formes galéniques nouvelles est donc un challenge pour permettre d'améliorer très sensiblement la résorption pulmonaire de diverses molécules à visée thérapeutique tout en minimisant leurs éventuels effets secondaires. C'est l'objectif que nous nous sommes fixés pour le traitement de l'aspergillose pulmonaire invasive par l'Amphotéricine B.

Actuellement, au sein du laboratoire de Pharmacie galénique de l'UFR Santé de Rouen, des travaux de recherche sont centrés sur les applications potentielles de polymères de cyclodextrines innovants (104) obtenus à partir d'un nouveau procédé de synthèse breveté (brevet Mohamed SKIBA, PCT WO 2011/080421 A1).

V. Les cyclodextrines (CDs) naturelles ou modifiées et les polymères de cyclodextrines (PolyCDs)

Les cyclodextrines natives (CDs), découvertes par Villiers en 1891, sont des oligosaccharides cycliques issus de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon par des amylases de type cyclodextrine-glycosyl-transférases (CGTase). C'est au début du 20^{ème} siècle que Shardingier a pu isoler la bactérie *Bacillus Macerans* à l'origine de la synthèse des cyclodextrines et ce n'est qu'en 1953 que Cramer, Freudenberg et Plieninger ont déposé le premier brevet mettant en avant la capacité de ces molécules à former des complexes d'inclusion avec des molécules organiques et démontrant ainsi leur aspect innovant en termes de solubilisation et stabilisation de substances actives à des fins thérapeutiques (105,106).

Les cyclodextrines natives sont formées de six, sept ou huit unités glucoypyrranose reliées par des liaisons glucosidiques de type α -1,4 et dénommées respectivement α , β et γ -cyclodextrine (Figure 15).

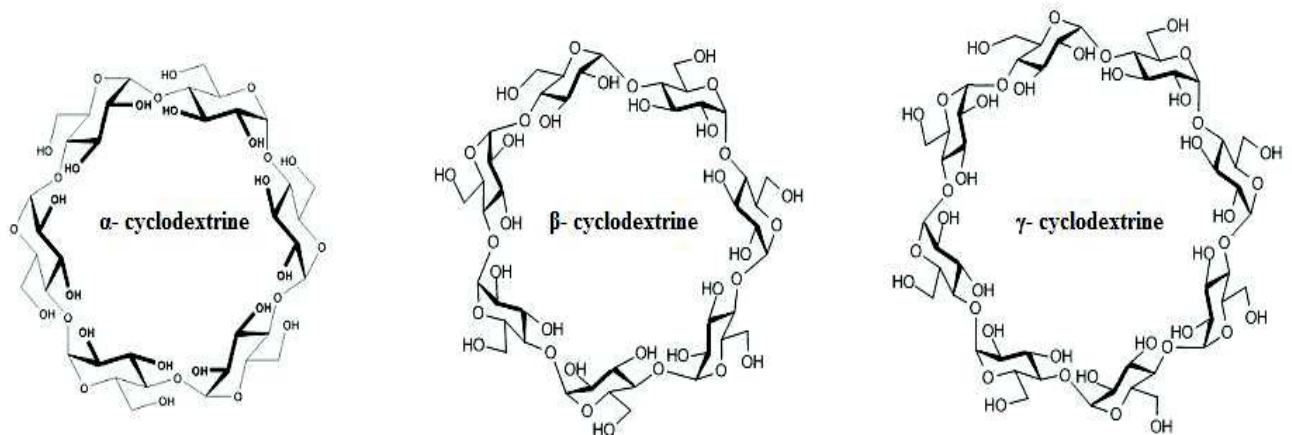


Figure 15 : Structure des cyclodextrines naturelles (α , β et γ)

Ces cyclodextrines naturelles ont la structure d'un cône tronqué, dans lequel les atomes d'hydrogène des unités glucose et les oxygènes des liaisons glycosidiques sont dirigés vers l'intérieur de la cavité du tore lui conférant une relative hydrophobicité. L'extérieur de la cyclodextrine présente un caractère polaire très marqué du fait de la présence de groupements hydroxyles. Cette structure pseudo-amphiphile leur confère la capacité de former des composés d'inclusion avec de nombreuses molécules bioactives. La complexation conduit à une

modification des propriétés physico-chimiques de la molécule "encapsulée" qui deviennent ainsi plus adaptées aux exigences galéniques.

Chacune des cyclodextrines naturelles est définie par une solubilité aqueuse maximale, fonction de sa structure et des dimensions de sa cavité (107).

En substituant chimiquement certains hydroxyles primaires ou secondaires des cyclodextrines natives par un radical méthyl, randomyl-méthyl- β -CD (RM- β -CD), propyl, hydroxypropyl (HP), perméthyl (PM) ou sulfobutylether (SBE), la solubilité aqueuse de ces cyclodextrines modifiées est très largement augmentée et peut encore améliorer la solubilité apparente du principe actif si celle-ci est limitée par la solubilité maximale de la cyclodextrine elle-même (108). (Tableau 2)

Tableau 2. : Solubilité aqueuse et Masse molaire des dérivés de cyclodextrines

Dérivés de cyclodextrine	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité aqueuse (g.L ⁻¹)
HPβ-CD	1400	>600
SBEβ-CD	2163	>500
RM-β-CD	1312	>500
HP- γ-CD	1576	>500

Parmi les cyclodextrines modifiées, seule la SBE β -CD (Captisol[®]) peut être administrée par voie parentérale car dépourvue d'un effet hémolytique sur les globules rouges contrairement aux autres types de cyclodextrines modifiées.

Les caractéristiques principales des CDs natives ainsi que leurs propriétés physico-chimiques sont décrites dans le tableau 3 (109).

Tableau3 : Caractéristiques structurales et propriétés physico-chimiques de α , β , et γ -CD

Caractéristiques	α - cyclodextrine	β - cyclodextrine	γ - cyclodextrine
Nombre d'unités glucopyranose	6	7	8
Formule brute	C ₃₀ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₂ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	972.85	1134.99	1294.14
Diamètre externe (Å)	14.6 ± 0.4	15.4 ± 0.4	17.5 ± 0.4
Diamètre interne de la cavité (Å)	4.3 - 5.3	6.0 – 6.5	7.5 – 8.3
Volume de la cavité (Å ³)	174	262	472
Hauteur (Å)	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.1
Nombre de molécules H ₂ O (cavité)	6 - 8	12	13
Solubilité aqueuse (g.L ⁻¹), T= 25°C	145	18.5	232
pKa, T=25°C	12.332	12.202	12.081
ΔH° ionisation (kcal.Mol ⁻¹)	8.36	9.98	11.22
ΔS° ionisation (cal.Mol ⁻¹ .K ⁻¹)	-28.3	-22.4	-17.6
$[\alpha]_D$, T= 25°C	150 ± 0.5	162.5 ± 0.5	177.4 ± 0.5

Les complexes d'inclusion avec les cyclodextrines

Les complexes d'inclusion de cyclodextrines sont préparés par divers procédés. On peut citer la méthode de fusion, la méthode par évaporation de solvants, le broyage ou encore la co-précipitation. D'autres techniques très utilisées dans la préparation des formes solides des médicaments ont montré leur intérêt pour la formation de complexes d'inclusion telles que la méthode de séchage par atomisation (spray-drying) (110–113) et la lyophilisation (114–116).

La formation d'un complexe d'inclusion est due à un phénomène de substitution des molécules d'eau, présentes à l'intérieur des cavités hydrophobes des cyclodextrines, par la molécule active. Cette complexation conduit à une modification des propriétés physico-chimiques de la molécule invitée comme l'augmentation de sa solubilité aqueuse intrinsèque, l'amélioration de sa vitesse de dissolution et donc de sa biodisponibilité, la modification du comportement spectral, la chiralité et donc un comportement différent dans le milieu biologique (117). Les forces impliquées dans ce phénomène d'inclusion sont essentiellement des liaisons de type hydrogène, des forces d'interactions électrostatiques ainsi que des forces

de Van der Waals. L'absence d'interactions fortes de type liaison covalente permettra par la suite une libération plus facile de la substance active (118,119).

Les intérêts principaux des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines sont de permettre d'augmenter de façon conséquente la solubilité des principes actifs peu hydrosolubles voire insolubles et d'accroître leur perméabilité membranaire dans le but d'améliorer leur biodisponibilité (Figure 16) (120,121).

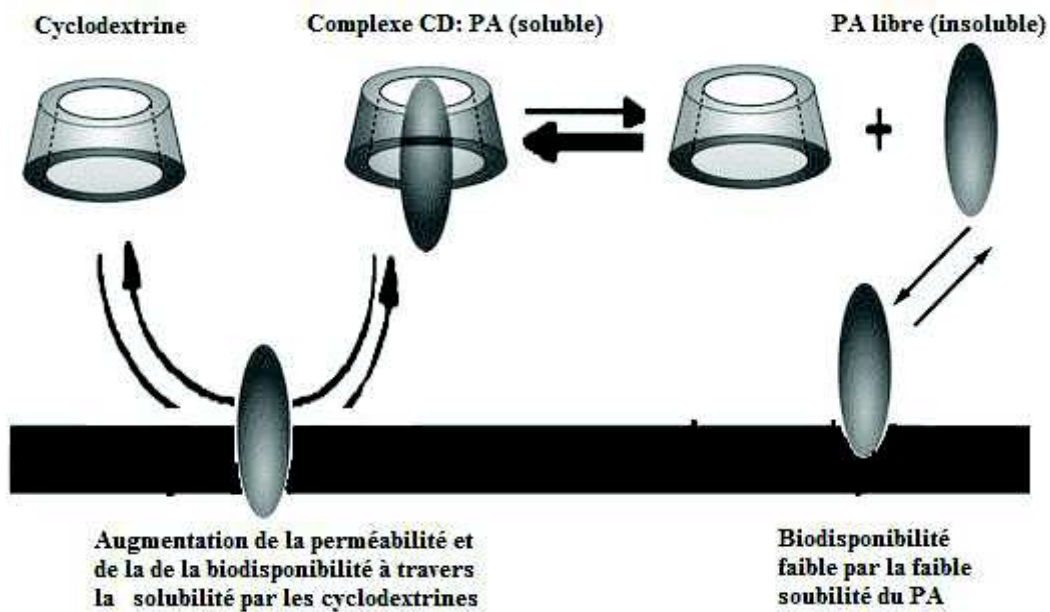


Figure 16 : Accroissement de la perméabilité membranaire par inclusion d'un principe actif dans les cyclodextrines

La réaction de complexation entre n entités d'un ligand (L) et m entités d'un substrat (D) donne naissance à un complexe $D_m L_n$. Cette réaction est réversible et se définit comme suit :



Le complexe formé peut résulter d'une inclusion totale ou partielle de la substance active avec un arrangement spécifique selon les paramètres physico-chimiques et stériques de la molécule hôte. Les complexes peuvent se former dans un rapport stoechiométrique différent (Figure 17).

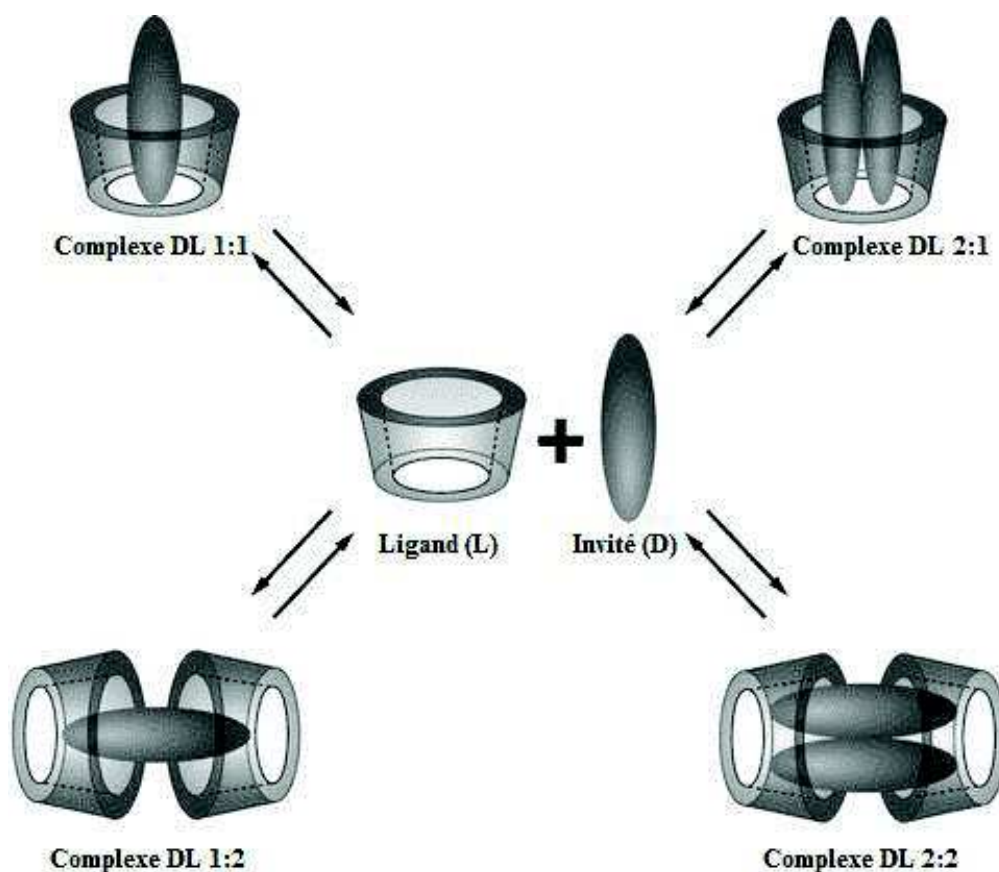


Figure 17 : Différents modes de complexation entre un ligand (L) (Cyclodextrine) et une molécule active invitée (D)

Diagrammes de solubilité de phases

En 1965, T.Higuchi *et al.* ont développé un modèle mathématique pour décrire le mécanisme de formation d'un complexe d'inclusion à partir d'une cyclodextrine naturelle. Cette approche mathématique permet d'étudier l'effet d'un solubilisant sur une substance solubilisée. Ce concept a permis de mettre en évidence l'interaction cyclodextrine (Ligand) /molécule active (molécule invitée) qui se traduira principalement par une amélioration de la solubilité initiale du substrat en présence de concentrations croissantes de cyclodextrines en solution aqueuse. La méthode d'Higuchi permet ainsi de déterminer le type de diagramme de solubilité de phases, le rapport molaire entre ligand et substrat et la constante de stabilité K_s .

Les diagrammes de solubilité de phase (Figure 18) indiquent deux types de complexes formés : un profil A qui désigne la présence d'un complexe solubilisé et un profil B qui indique la formation d'un complexe non solubilisé.

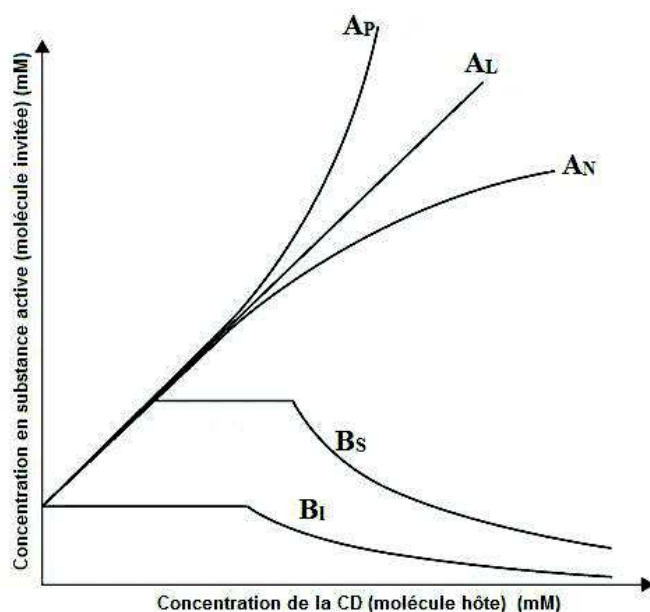


Figure 18 : Diagrammes théoriques de solubilité de phases selon Higuchi & Connors

- A_L : correspond à la formation d'un composé d'inclusion dont la stœchiométrie est équimolaire (1:1) ou (2:2) ou (3:3).
- A_p : la courbe est dite "positive", c'est à dire incurvée vers le haut. Dans ce cas, le rapport est non équimolaire, il faut plusieurs molécules "invitées" pour une molécule de cyclodextrine.
- A_n : cette courbe est dite "négative" et est incurvée vers le bas. Cependant son origine reste incertaine, elle pourrait être due à un changement de la constante de formation du complexe, à l'altération du solvant ou bien encore à l'association de molécules de ligands entre elles à de fortes concentrations.
- **B** caractérise la formation de complexes insolubles.

Ce diagramme peut être décomposé en 3 parties, pour le diagramme de type **Bs** :

Partie 1 : linéaire, reflète l'augmentation de la solubilité du ligand.

Partie 2 : représente un plateau où l'on atteint la limite de solubilité du composé formé.

Partie 3 : descendante, le ligand solide a été complètement consommé. Cette phase correspond à la consommation du substrat et simultanément à la précipitation du complexe.

- Il existe un autre type de courbe, le type **Bi**, qui indique la formation d'un complexe insoluble (on ne voit alors que les parties 2 et 3 du diagramme).

L'établissement de ces diagrammes de solubilité permet de calculer à partir de la portion ascendante rectiligne de la courbe une constante de stabilité apparente K_s (M^{-1}), en se fondant sur l'équation suivante :

$$K_s = \frac{a}{S_0 \cdot (1-a)}$$

a : pente de la droite ascendante du diagramme de solubilité

S_0 : solubilité apparente du principe actif dans l'eau. (M)

Cette constante reflète la stabilité du complexe formé et le devenir de ce complexe dans les milieux biologiques. Plus la constante de stabilité a une valeur faible, plus vite est libéré le principe actif.

Dérivés de cyclodextrines

Les cyclodextrines modifiées, dérivées des cyclodextrines natives, ont fait l'objet de nombreuses études au sein de notre laboratoire pour montrer leurs intérêts à accroître la solubilité de divers principes actifs peu hydrosolubles (113,122).

Même si la β -cyclodextrine est celle qui représente la plus faible solubilité aqueuse, elle reste la plus utilisée dans les médicaments commercialisés (58%) du fait de son moindre coût suivie par l'hydroxypropyl β -CD (16%), l' α -cyclodextrine (9,6%) ainsi que par l'hydroxypropyl γ -CD (105).

Applications des cyclodextrines à l'Amphotéricine B

La complexation de l'AmB dans les cyclodextrines natives et leurs dérivés a été étudiée au niveau de notre laboratoire(123) ainsi que par diverses autres équipes de recherche. Les résultats convergent vers une utilisation plus adéquate de la γ -CD pour solubiliser l'AmB, vraisemblablement de par la taille de sa cavité plus adaptée à l'encombrement stérique de la

molécule active (124–126) (Figure 19), en formant un complexe d'inclusion de type (1:1)(127,128). De ce fait, de nombreux travaux montrent l'intérêt de développer des formulations impliquant un complexe d'inclusion γ -CD/AmB pour le traitement de diverses infections et mycoses.

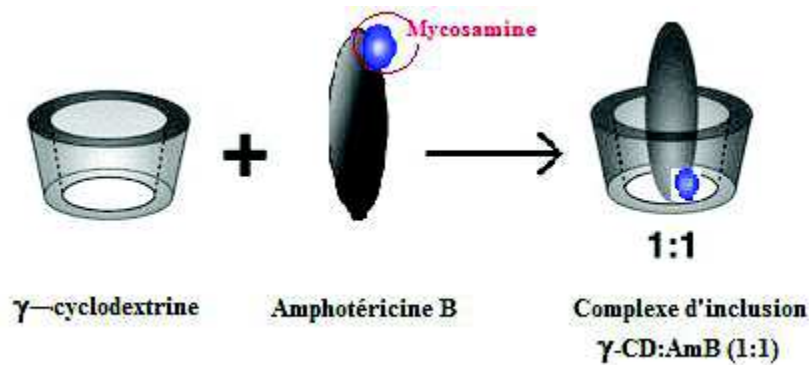


Figure 19 : Mécanisme de formation du complexe d'inclusion (γ -CD : AmB)

Le développement d'une suspension à base d'un complexe d'inclusion γ -CD/AmB et destinée à une administration par voie ophtalmique a permis d'obtenir un meilleur taux de solubilité, une plus grande stabilité chimique et une efficacité antifongique plus marquée vis-à-vis du champignon *Candida Albicans* par rapport à la suspension de Fungizone® à usage ophtalmique disponible sur le marché (125).

L'inclusion de l'AmB dans la γ -CDa été également étudiée pour le développement d'une crème à usage cutané contre *Leishmania spp* et des études *in vivo* ont montré que sous forme complexée, l'AmB augmentait nettement l'index thérapeutique principalement par un rôle synergique de déstabilisation de la membrane de l'espèce fongique. L'activité fongique a pu ainsi être améliorée (taux d'efficacité supérieur à 60%) comparativement à la spécialité pharmaceutique Clotrimazole® ou encore à l'AmB dissout dans le diméthylsulfoxyde (taux d'efficacité de 28%)(128).

D'autres études ont été menées pour tester l'intérêt thérapeutique des γ -CD modifiées comme l'hydroxypropyl- γ -CD utilisée pour solubiliser l'AmB dans une structure copolymérique multi-blocs à base de Pluronic (MBCP-2) en vue d'une application vaginale. L'étude *in vitro* a montré une libération constante de l'AmB à partir de la structure MCPB-2 et à pH=5, et une

application locale répétitive de cette formulation a permis le traitement de l'inflammation dans les tissus vaginaux (129).

Quant aux dérivés de la β -CD comme HP- β -CD ou SEB- β -CD, ils ont surtout été utilisés comme agent stabilisant dans des formulations de liposomes. Des études *in vivo* sur des rats ont montré une amélioration de l'index thérapeutique après administration de ces liposomes avec une efficacité augmentée et une activité hémolytique réduite par rapport aux liposomes d'AmB de type conventionnel dans le cas d'une infection fongique systémique(59,130).

Les polymères de cyclodextrines

Des polymères ont déjà été synthétisés à partir de cyclodextrines selon différentes voies, avec des masses molaires et des rendements variables mais en dépit d'une recherche poussée, aucun de ces polymères n'est à même de remplacer les cyclodextrines naturelles ou modifiées car la toxicité des agents de réticulation et la nature des solvants impliqués au cours du procédé de fabrication freinent leurs utilisations, notamment dans le domaine pharmaceutique pour des applications biomédicales.

De nouveaux polymères de cyclodextrines (polyCD) ont été synthétisés au sein de notre laboratoire par une méthode de fusion basée sur une réaction de polycondensation des groupements hydroxyles libres (-OH) des cyclodextrines avec un monomère bi-fonctionnel (ou multifonctionnel) de type polyacide (comme l'acide citrique) (Figure 20). Ce type de réaction permet d'éviter l'étape de pré-modification chimique des cyclodextrines, indispensable dans un procédé de polymérisation radicalaire ou ionique. L'originalité de ce procédé de synthèse repose sur la simplicité de préparation, le profil non toxique des monomères et l'absence de tout solvant. Le procédé permet aussi d'échapper à des catalyses lourdes et coûteuses et de simplifier l'étape de purification par la simple utilisation de méthodes membranaires. Au cours de la synthèse, la température et le temps de réaction sont les facteurs déterminants pour obtenir des polymères soit solubles ou insolubles.

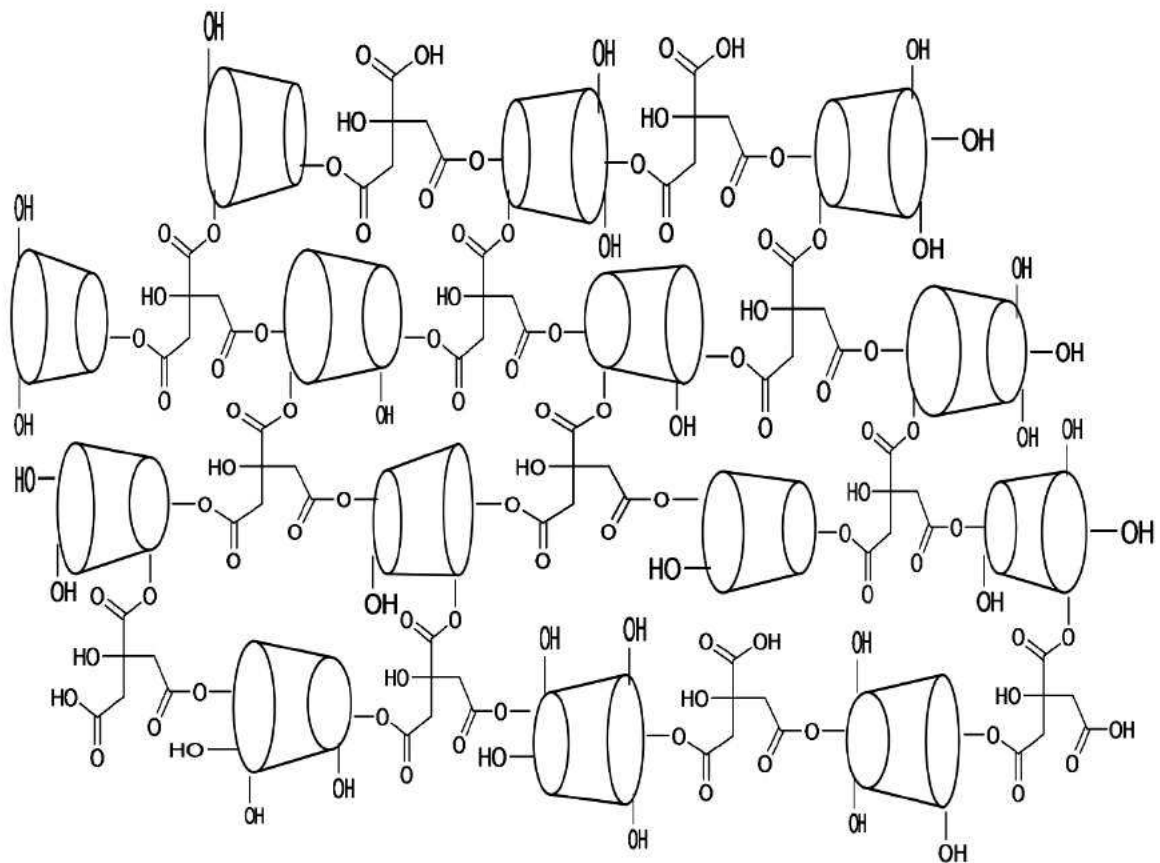


Figure 20 : *Polymères de cyclodextrines obtenus par une méthode de polycondensation par fusion (Brevet Mohamed SKIBA)*

Différents types de polyCD solubles et insolubles sont ainsi obtenus : des copolymères (poly α -CD, poly β -CD et poly γ -CD)(Figure 21), desterpolymères (poly $\alpha\beta$ -CD, poly $\beta\gamma$ -CD et poly $\alpha\gamma$ -CD), et des tétrapolymères (poly $\alpha\beta\gamma$ -CD)(131). Les polymères obtenus ont un poids macromoléculaire de l'ordre de 310 000 Da pour le copolymère γ -CD, 272 000 Da pour le copolymère β -CD et de 240 000 Da pour le copolymère α -CD. Ils présentent une solubilité aqueuse maximale à haute valeur ajoutée comparativement aux cyclodextrines natives et modifiées puisque celle-ci est de l'ordre de 1 g/mL pour tous les types de poly CD.

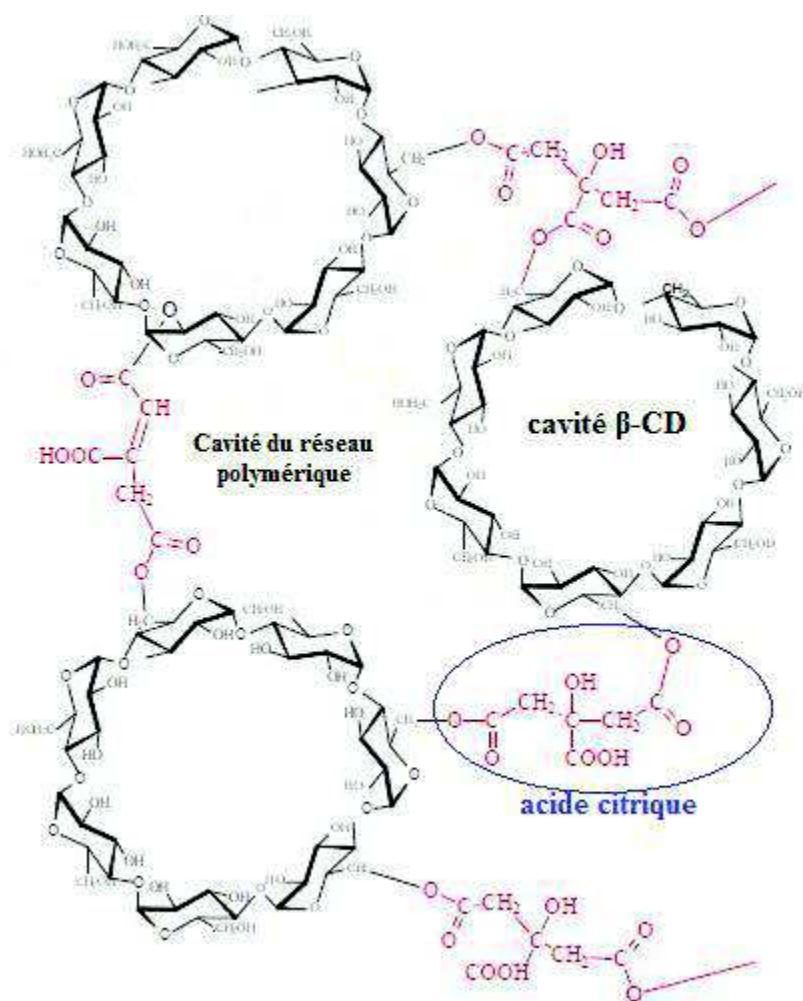


Figure 21 : Structure représentative du copolymère β-CD

De part leur structure, les polyCD constituent des systèmes bi-fonctionnels combinant à la fois les propriétés spécifiques de complexation des cyclodextrines et un effet d'hydrophilisation des principes actifs par dispersion entre les cavités des cyclodextrines.

Des études préalables au sein de notre laboratoire ont déjà démontré que ces systèmes innovants constituent un outil galénique performant avec des potentialités pour des applications pharmaceutiques. Par la méthode d'Higuchi, il a été montré que le pouvoir solubilisant des polyCD solubles est très largement supérieur à celui des CD natives avec un intérêt pour améliorer la solubilité de principes actifs peu voire insolubles en milieu aqueux (132,133). De même, ces polyCDs ont montré des potentialités intéressantes en tant qu'excipients et en tant que systèmes matriciels à libération contrôlée pour des molécules médicamenteuses (133,134).

VI. Nouvelle génération de dispersions solides amorphes sphériques (DS 4.0) à base de polymères de cyclodextrines

Définition

Les dispersions solides sont utilisées depuis de nombreuses années dans l'arsenal des procédés technologiques pour améliorer la vitesse de dissolution dans les systèmes biologiques de principes actifs peu solubles dans l'eau. Le principe consiste à hydrophiliser les principes actifs de faible solubilité aqueuse en les dispersant à l'état solide dans un excipient solide (polymère) généralement très hydrosoluble. Les dispersions solides peuvent être préparées par diverse méthodes : soit par la méthode des cofondus par fusion, soit par la méthode des coprécipités par évaporation de solvants.

Une substance active sous forme d'une dispersion solide peut conduire à un mélange total ou partiel et celle-ci peut être dispersée au sein de ce système à l'état moléculaire ou encore à l'état de particules amorphes ou cristallines. La matrice obtenue peut également présenter un état cristallin ou amorphe (135). En améliorant la biodisponibilité d'une molécule d'intérêt thérapeutique par une meilleure mouillabilité, une porosité améliorée et des changements polymorphes, les dispersions solides présentent de nombreux avantages par rapport à d'autres techniques de solubilisation.

Dans les formulations classiques, les particules s'agglomèrent facilement durant la mise en forme pharmaceutique, pendant le processus de dissolution ou encore pendant le stockage (136,137) mais sous forme de dispersions solides, ces problèmes d'agglomération particuliers sont évités sans avoir recours à l'utilisation d'autres techniques comme celle de la nanocristallisation nécessitant des stabilisants ainsi qu'un équipement et un processus particuliers (138).

Une réduction non négligeable de la taille des particules améliore leur solubilité et leur vitesse de dissolution par une mouillabilité augmentée, en particulier lorsque des tensioactifs sont incorporés en plus. Une faible taille particulière réduit également le risque d'agglomération des particules médicamenteuses dans le milieu de dissolution et le principe actif va être libéré en état sursaturé, ce qui est avantageux pour son absorption selon la loi de diffusion de Fick (125,126).

Les médicaments peuvent exister sous différentes formes amorphes qui ont une stabilité thermodynamique plus faible que les particules à l'état cristallin, conduisant ainsi à une dissolution plus rapide *in vivo*. Généralement, une substance active hydrophilisée au sein d'une dispersion solide va se retrouver dans un état amorphe même si ce composé était initialement sous forme cristalline (139). Dans la matrice solide, l'état polymorphe du principe actif est principalement déterminé par le procédé de préparation et la nature des interactions physico-chimiques mises en jeu (140). Les dispersions solides produites par la méthode d'évaporation de solvant ont tendance à présenter une structure assez poreuse du fait de l'élimination du solvant et conduisent donc à un taux de dissolution élevé et rapide (122). Le choix du polymère comme excipient inerte hydrophile influence également la porosité des dispersions solides (141). Les dispersions solides sont facilement administrées en tant que formes solides pour la voie orale et permettent d'obtenir une meilleure compliance pour le patient (142).

Classification des dispersions solides

Les dispersions solides peuvent être classées selon différents aspects tels que leur composition, leur processus de préparation ou leur profil de libération. En se basant sur leur composition, quatre générations se distinguent :

- la première génération (DS 1.0) correspond aux dispersions solides cristallines ;
- la seconde génération (DS 2.0) concerne la dispersion d'une substance active dans une matrice de structure amorphe, généralement de nature polymérique ;
- La troisième génération (DS 3.0) est basée sur le principe de la deuxième génération sauf qu'un additif sera présent au sein de la matrice afin d'améliorer la performance biopharmaceutique ;
- La quatrième génération correspond aux dispersions solides amorphes à base d'un polymère hydrophile considéré comme le seul excipient sans avoir recours à l'ajout d'additifs supplémentaires.

Première génération (DS 1.0)

Les dispersions solides de première génération correspondent à des molécules médicamenteuses cristallines dispersées dans des matrices solides pour former un mélange cristallin. Un exemple est celui du mélange eutectique de sulphathiazole et d'urée en tant que support hydrophile (143). Le mélange eutectique simple est habituellement préparé par

solidification rapide d'un mélange liquéfié de deux composants solides obtenu préalablement par fusion (144). Le point de fusion du mélange est inférieur au point de fusion de la molécule active et à celui du support solide. En outre, les mélanges eutectiques conduisent à la cristallisation simultanée du PA et du support dans la dispersion solide (135).

La cristallinité de telles dispersions solides peut cependant représenter un inconvénient significatif car les composés cristallins ont une énergie libre de Gibbs plus faible que celle des composés amorphes et par conséquent un taux de dissolution plus faible (145).

Deuxième génération (DS 2.0)

La seconde génération de dispersions solides correspond à la dispersion d'un PA peu soluble voire insoluble dans une structure amorphe de nature polymérique (146). Ce type de dispersions solides amorphes a permis d'obtenir une meilleure vitesse de dissolution de la forme médicamenteuse du fait d'une stabilité thermodynamique plus faible (147,148). Certaines molécules de PA ont un effet plastifiant sur les polymères ou interagissent à travers des liaisons hydrogènes avec la matrice. Ces interactions peuvent influencer les propriétés physiques et la stabilité des dispersions solides et/ou le profil de dissolution du médicament.

Nous pouvons distinguer trois formes de dispersions solides : la première est la solution solide amorphe où le PA et le support amorphe sont complètement miscibles et forment un mélange homogène. La seconde forme est la suspension solide amorphe qui est constituée de deux phases distinctes et la dernière forme est un mélange des deux (149).

Troisième génération (DS 3.0)

Pour cette génération de dispersions solides, le principe actif insoluble dans l'eau est dispersé au sein d'une structure amorphe et l'ajout d'un additif comme un tensioactif va permettre de ralentir la recristallisation du principe actif durant le stockage à travers la formation de micelles ou par adsorption sur la couche externe des molécules actives empêchant ainsi leur agglomération. Dans cette optique, divers tensioactifs peuvent être utilisés comme le béhénate de glycéryle (Compritol 888 ATO®) (150), Inutec SP1®, Neulisin®, l'huile de ricin polyéthoxylée (Kolliphor EL®). Malgré l'amélioration du profil de dissolution à travers l'utilisation d'additifs, l'inconvénient de ce type de système reste la dispersion hétérogène du PA ou de l'additif dans la matrice amorphe.

Quatrième génération (DS 4.0)

Pour cette génération de dispersions solides, l'aspect innovant consiste à utiliser un excipient possédant des propriétés amorphes ou des propriétés tensioactives pour permettre une bonne solubilisation et une meilleure distribution du principe actif dans la matrice. La préparation de dispersions solides à partir de polymères de cyclodextrines, un excipient avec un rôle à la fois solubilisant et complexant, constitue une approche originale (Figure 22) (151,152).

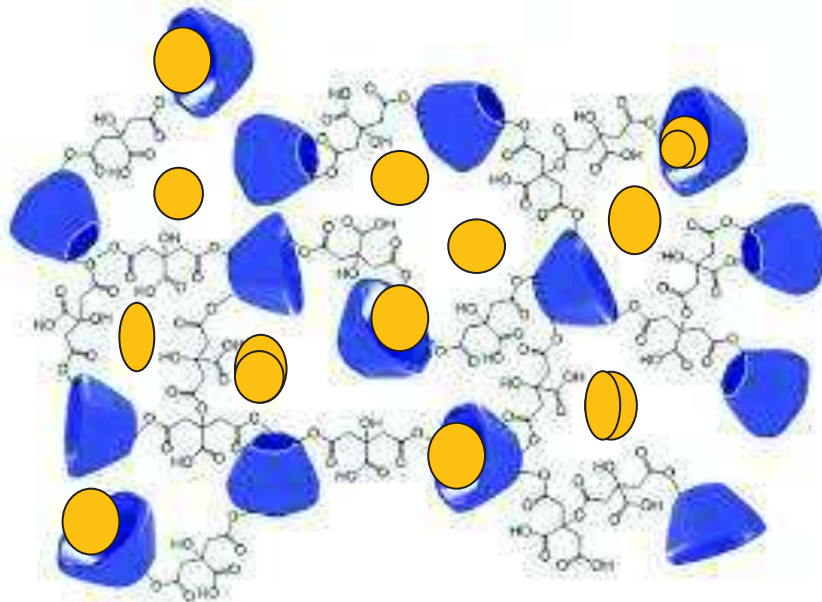


Figure 22 : Schéma représentatif d'une nouvelle génération de dispersions solides amorphes à base de polymères de cyclodextrines (DS 4.0) pour l'hydrophilisation d'un principe actif insoluble

Préparation des dispersions solides

Les dispersions solides sont préparées principalement par les méthodes de co-broyage, de fusion ou d'évaporation de solvants.

Méthodes de co-broyage

C'est l'un des procédés les plus simples pour la formulation des dispersions solides et qui consiste à effectuer un broyage du principe actif et de la matrice sans ajout de solvant ni chauffage sachant que le broyage à basse température permet l'amorphisation du principe actif contrairement à l'utilisation de températures supérieures à la température de transition vitreuse (T_g) qui permet l'obtention de formes cristallines. Ce procédé permet aussi la réduction de la taille des particules mais il reste néanmoins le moins approprié car le système

obtenu présente une certaine hétérogénéité, des interactions faibles ainsi qu'une stabilité physique limitée.

Méthodes de fusion

Les procédés de fusion sont appropriés pour des matériaux stables à la chaleur avec de faibles points de fusion. Le principe de base consiste à faire fondre la molécule active et le support inerte à une température légèrement supérieure à leur point eutectique, à mélanger les composants liquéfiés puis à refroidir ce mélange pour obtenir une dispersion solide homogène. Dans certains cas, une étape supplémentaire de broyage et de tamisage va permettre de réduire et homogénéiser la taille des particules obtenues. Les principaux avantages de la méthode de fusion sont la simplicité de la préparation, le coût relativement peu élevé et l'absence de solvants limitant ainsi les problèmes de toxicité potentielle de la formulation pour un usage pharmaceutique. Cependant, les procédés de fusion présentent également certains inconvénients comme la nécessité de travailler parfois à des températures élevées, une hétérogénéité de dispersion de la molécule active au sein de la matrice et une moindre porosité du produit final obtenu. Pour limiter ces inconvénients, des adaptations ont été apportées à la méthode de base. En ce qui concerne le risque d'altération du médicament ou du support à des températures élevées, la technique utilisée pour réduire le temps de chauffage du procédé est de disperser la molécule active dans un support fondu au lieu de chauffer simultanément les deux composants pour obtenir le mélange fondu. En se basant sur le principe de base des méthodes de fusion, deux procédés ont été brevetés: MeltDose® (Lifecycle Pharma A/S) et Lidose® (laboratoire SMB). Dans le procédé MeltDose®, le PA incorporé dans un support en mousse est pulvérisé sur des particules porteuses inertes en utilisant un équipement à lit fluidisé qui est l'originalité de ce procédé. Les particules sèches obtenues peuvent être transformées par la suite en capsules ou en comprimés avec l'exemple des comprimés de fénofibrate (spécialité Fenoglide™) commercialisés aux USA. En ce qui concerne la technologie Lidose®, la substance médicamenteuse, après mélange avec le support fondu, pourra remplir des capsules dures après refroidissement dans des conditions spécifiques.

Dans certains cas, l'utilisation de tensioactifs est nécessaire pour augmenter la miscibilité du principe actif dans le support à haute température. Il est cependant à noter qu'une grande quantité de tensioactifs dans une dispersion solide peut induire la formation d'une couche de gel pendant la dissolution du produit dans l'eau qui risque d'agir comme une barrière de

diffusion et de retarder la libération du PA. En outre, les propriétés des agents tensioactifs peuvent varier en fonction de la température du mélange.

De plus avec ou sans tensioactifs, il est important d'effectuer un procédé de refroidissement rapide pour empêcher tout phénomène de démixtion et une recristallisation du médicament, ce qui va permettre d'accroître sa vitesse de dissolution *in vivo*. Les différentes méthodes de refroidissement pour les dispersions solides peuvent être une agitation en utilisant un bain de glace, une immersion dans l'azote liquide ou encore un épandage du mélange fondu chaud sur une couche mince d'acier inoxydable refroidi par de l'air.

Plus récemment, l'extrusion à chaud a été développée pour obtenir un mélange homogène entre le principe actif et le support et limiter le risque d'hétérogénéité du médicament dans les dispersions solides (153). Ce procédé consiste à mélanger, à chauffer, à fondre, à homogénéiser et à extruder simultanément le PA et le support. L'extrudat obtenu pourra par la suite être utilisé pour formuler des comprimés ou d'autres formes pharmaceutiques. Le mélange intense et l'agitation forcée par la vis rotative pendant le procédé provoquent la désagrégation des particules médicamenteuses dans le support conduisant à une dispersion homogène. Un tel procédé présente l'avantage d'être simple, rapide donc de réduire le risque d'altérations des composants par exposition longue à une température élevée, facilement transposable à l'échelle industrielle et de permettre une production en continue. Cette technologie a été utilisée pour concevoir de nombreux systèmes de délivrance de médicaments tels que des comprimés à libération immédiate et contrôlée, des granulés, et des implants.

Méthode d'évaporation de solvants

Parmi les méthodes de préparation des dispersions solides par évaporation de solvants, la méthode de séchage par atomisation ou spray-drying est une technique appropriée et c'est celle que nous allons développer plus en détail.

Technique d'atomisation par spray-drying®

Le spray-drying® est une technique de séchage par atomisation à l'aide d'une chambre de séchage et d'une buse dans différentes conditions possibles de température et de pression (Figure 22). C'est un procédé rapide, économique et facilement transposable à l'échelle industrielle. Il consiste à extraire un solvant volatil d'une solution ou d'une suspension pour

obtenir au final une poudre sèche avec un caractère amorphe marqué (7,132,154–157). Cette technique a largement été utilisée pour réduire la taille des particules médicamenteuse, pour améliorer les propriétés physico-chimiques des principe actifs insolubles ou peu solubles dans l'eau et surtout pour permettre d'augmenter le taux de dissolution à travers une meilleure solubilisation de la molécule active dans la matrice par le changement de l'état cristallin moléculaire ainsi que par la mise en jeu d'interactions favorisées.

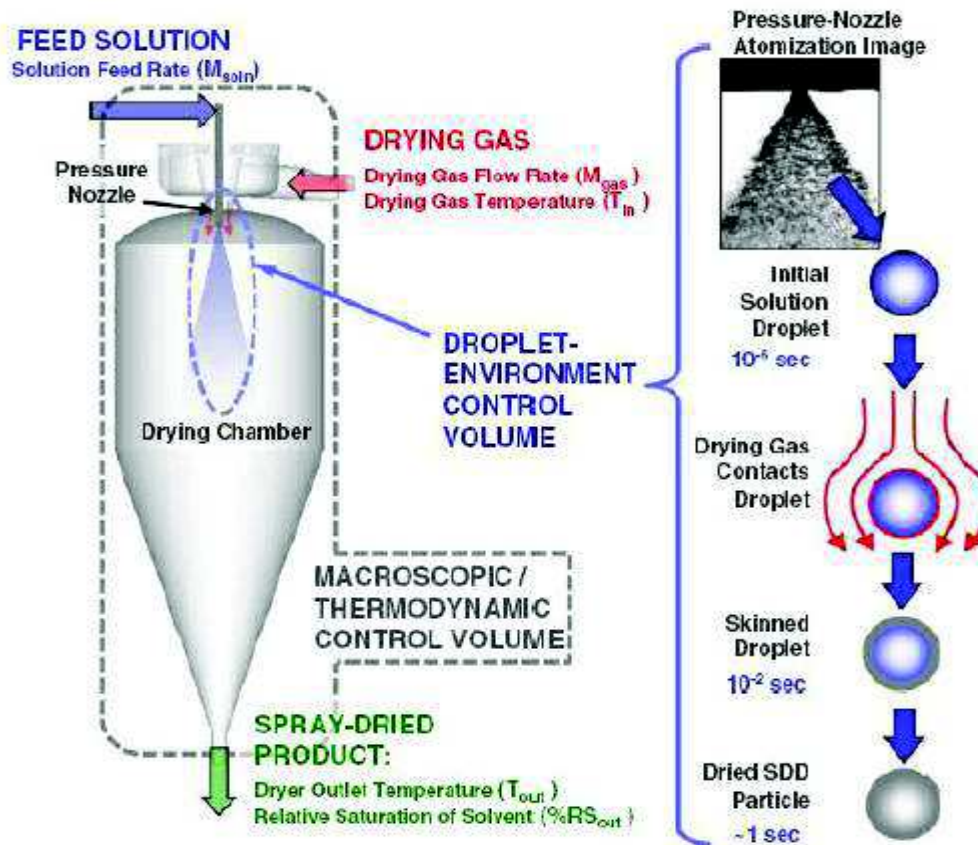


Figure 23 : Schéma d'un appareil de séchage par atomisation ou spray-dryer®(Thèse T.Boukhris-Université de Rouen 2012.)

Afin d'optimiser le procédé d'atomisation, plusieurs paramètres sont à prendre en compte :

- Le débit d'alimentation

C'est le premier paramètre important pour atteindre l'équilibre et qui permettra un meilleur séchage des particules lors de leur passage à l'état solide. Le débit de passage de la solution influe sur le degré de saturation. L'augmentation du débit de solution

peut entraîner une diminution de la taille des particules sèches obtenues et favoriser un état cristallin.

- Les températures d'entrée (T_{inlet}) et de sortie (T_{outlet})

La température à laquelle sont soumises les gouttelettes liquides est le paramètre déterminant de la structure interne de la poudre sèche produite. La température d'entrée T_{inlet} permet de garantir l'équilibre du transfert thermique (rapport entre conduction et convection) jusqu'à l'atteinte du bloc de sortie à la température T_{outlet} . La cinétique d'évaporation du solvant est le seul facteur responsable de la formation de particules solides. Une étude réalisée sur le rapport entre la morphologie, la cinétique de dissolution ainsi que l'amorphicité(158) a montré que l'état amorphe le plus stable pour une molécule active est atteint lorsque la température T_{inlet} est comprise entre la température de transition vitreuse (T_g) et la température de recristallisation. Une température T_{inlet} supérieure peut générer moins de solvant résiduel dans la poudre finale mais avec une hygroscopicité supérieure. La température de sortie (T_{outlet}) est celle qui détermine la morphologie et l'état de surface des particules solides générées. Une des contraintes rencontrée lors de l'utilisation des poudres sèches administrées par voie pulmonaire est que l'atomisation des principes actifs peu hydrosolubles à des températures inférieures à 100°C a tendance à produire des poudres sèches très collantes. Ces poudres auront tendance à s'agglomérer et seront difficilement séparées durant leur inhalation par le patient à cause de forces capillaires dues à l'humidité résiduelle.

Pour un principe actif à utilisation pulmonaire via une inhalation, et selon les normes établies par la Pharmacopée Européenne, il est important que le pH de la solution ou suspension à atomiser pour l'obtention d'une poudre sèche soit compris entre [3 – 8.5]. Selon des études menées (159), il serait déconseillé d'utiliser des solutions en dessous d'un pH = 5 afin d'éviter de provoquer une bronchoconstriction lors de l'inhalation des poudres sèches.

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La validation de la méthode de dosage analytique de l'Amphotéricine B par la méthode HPLC a été réalisée selon les guides pratiques de validation analytique établis par l'ICH (160,161) en utilisant un système de chromatographie HP 1100 [Agilent Technologies, Santa Clara, CA, États-Unis] équipé d'une pompe binaire, d'un injecteur automatique et un détecteur de diodes avec une longueur d'onde de détection réglable. Les séparations étaient effectuées par une colonne Purospher® Star RP-C18 en phase inverse à une température ambiante. La pureté de l'AmB a été calculée à partir de trois concentrations différentes et a été estimée supérieure à 95%.

Afin d'étudier la sensibilité du système, nous avons déterminé la limite de détection (LLOD) (0.1 µg/ml) et la limite de quantification (LLOQ) (0.36 µg/ml). L'estimation de la précision du système a été réalisée à partir d'un standard d'AmB sur six injections, et le coefficient de variation était égal à 0,16% (< 1,0%).

Afin de permettre l'obtention d'un meilleur rapport signal/bruit, nous avons redéfini les proportions de phase mobile et validé la méthode (Figure 23).

Les conditions opératoires pour la méthode de dosage de l'AmB étaient donc les suivantes:

- **Colonne chromatographique: RP-18 (5 µm) Hibar-RT (250 x 4,6) mm Purospher**
- **Phase mobile: (MeOH/ACN/EDTA 2,5mM) (40/30/30)(v/v/v)**
- **Longueur d'onde $\lambda = 405 \text{ nm}$.**
- **Volume d'injection = 10 µl.**
- **Temps de rétention = 10,5 min.**

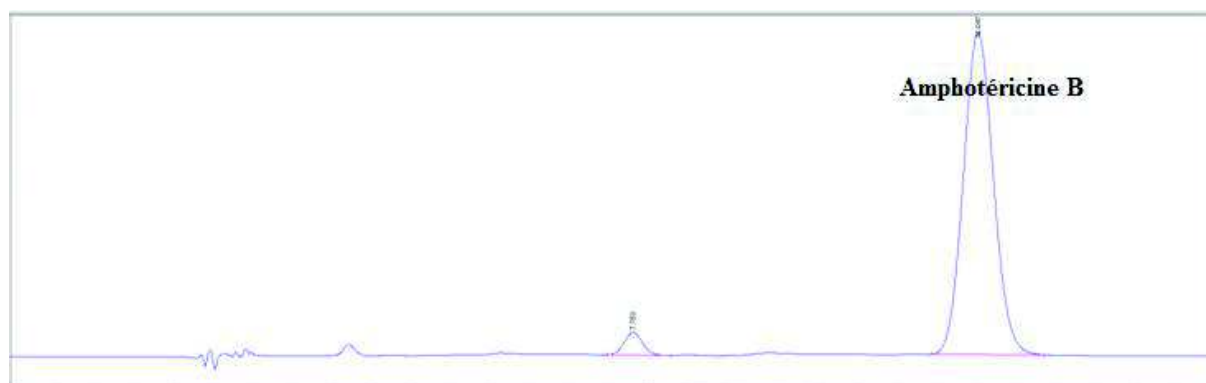


Figure 24 : Chromatogramme de l'AmB dans une solution (MeOH :DMSO) (10:1)

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que la méthode analytique que nous avons développée pour le dosage de l'AmB est spécifique, linéaire dans un intervalle de dosage [0,5 – 50] µg/ml où la courbe de régression montre une linéarité de la réponse chromatographique avec un coefficient de corrélation égal à 0,999 et une équation de droite : $Y = 60,28 X + 8,724$. La précision de la méthode (n=12) ainsi que la répétabilité (n=18) sont respectivement estimées à 3,32% et 3,28% (Coefficient de variation < 5 %), donc on peut dire que la méthode est reproductible et répétable. Le pourcentage de recouvrement a été calculé sur les formulations à base de polymères de cyclodextrines chargées en AmB. Le fait d'ajouter des quantités d'AmB dans une solution d'échantillon donne un pourcentage de recouvrement compris entre 99.71% et 101,03% (n = 10).

Cette méthode a été utilisée pour la quantification de l'AmB dans les matrices formulées lors des études de solubilité (méthode d'Higuchi) et des études de lyodisponibilité (tests de dissolution) menées au cours de nos travaux de recherche.

Spectrophotométrie d'absorption UV-visible

Un équivalent de 1 mg d'AmB a été préparé à partir des différents lots de dispersions solides amorphes [Poly γ -CD:AmB] dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration de 10 µg /mL. Les échantillons ont été analysés par Spectrophotométrie d'Absorption UV/Visible à l'aide d'un spectromètre 1600PC [VWR, Radnor, PA, USA] par balayage de longueur d'onde comprise entre [300-450] nm. La même concentration de polymères de cyclodextrine [Poly γ -CD] sans AmB était utilisée comme blanc. Les spectres UV obtenus pour le principe actif seul et pour la matrice du polymère étaient comparés au spectre de référence de l'AmB obtenu dans le DMSO afin d'évaluer la distribution des formes présentes dans les nouvelles préparations.

Analyse calorimétrique différentielle (DSC)

C'est une technique d'analyse thermique basée sur la différence d'échange de chaleur entre la forme solide à analyser et un échantillon de référence inerte en effectuant un balayage de température. Elle permet d'analyser les formes solides et d'évaluer leur comportement par un changement d'enthalpie (ΔH) dû au changement de température. Elle permet de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des dispersions solides et des polymères de cyclodextrines comme la température de fusion (T_f), et la température de transition de

phase(T_g). Lors de nos expériences, nous avons travaillé sur des quantités de 5mg de dispersions solides et l'appareil utilisé était de marque TGA 4000® [Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA]. Les thermogrammes ont été analysés dans un intervalle de température [30-700] °C avec une augmentation de température régulière de 10°C sous flux d'azote de 20 mL/min.

Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les pertes de masse ont été enregistrées à l'aide d'un appareil TGA 4000® [Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA] sur des échantillons de 5 mg à une vitesse de chauffage de 10°C dans la plage de température de 30°C à 700°C et sous un flux de gaz d'azote [20ml/min]. Les thermogrammes de l'analyse des différents échantillons (l'amphotéricine B, les polymères de cyclodextrines, les mélanges physiques et les dispersions solides amorphes) ont été enregistrés après trois analyses.

Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

C'est une technique utilisée pour mettre en évidence les interactions de l'AmB au sein des structures polymériques de cyclodextrines à l'état solide. Différents échantillons ont ainsi été testés : AmB pure, dispersions solides amorphes à base de différents polymères, poudres sèches obtenues après nos procédés de formulation par spray-drying ainsi que les mélanges physiques. Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectrophotomètre PerkinElmer équipé d'un ATR, entre 4000 cm^{-1} et 700 cm^{-1} avec une résolution de 8 cm^{-1} . Les spectres IR ont été enregistrés après 20 balayages et après trois essais.

Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les expériences de RMN ^1H ont été enregistrées à une température de 22°C sur un spectromètre Bruker AVANCE III 400 RMN en utilisant une pré-saturation de la résonance de l'eau, des points de données de 32 K, un délai de recyclage de 2 s et une largeur spectrale de 10 ppm. Le réglage de la résonance de l'eau à 4,75 ppm mentionnait les changements chimiques. L'affectation des pics de ^1H -RMN a été établie à partir des données publiées et en utilisant des expériences de corrélation basiques(162), des expériences de relaxation par inversion-récupération (T1) et Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (T2) utilisées dans la bibliothèque de logiciels Bruker.

Les expériences de ^{31}P -RMN ont été effectuées à 162 MHz. Les spectres de phosphore ont été enregistrés à l'aide d'une séquence d'écho dipolaire(163) : $\pi / 2$ -t- π -t avec une valeur t de 12

*sec, un délai de recyclage de 3s et un découplage composite de protons. L'acide phosphorique (85%) a été utilisé comme référence externe : $\pi / 2 - t - \pi / 2 - t$.

Résonance paramagnétique électronique (ESR)

C'est une technique spectroscopique très utilisée dans l'étude de la fluidité des membranes. Cette technique de caractérisation qualitative ressemble à la résonance magnétique nucléaire des noyaux atomiques sauf qu'elle est plus ciblée sur l'étude des électrons libres présents à l'état solide ou liquide. Elle permet de mettre en évidence les interactions des espèces chimiques instables avec les noyaux atomiques présents dans leur environnement chimique à l'interface solide-liquide. Cette technique est utilisée dans l'étude de la mobilité électronique à la surface de membrane et nous l'avons utilisée pour étudier spécifiquement les chaînes C₂-C₇ des chaînes phospholipidiques des liposomes multi-lamellaires (MLV) dans les conditions opératoires suivantes : puissance micro-ondes 10.00 mW, fréquence de modulation à 100 kHz, une amplitude de modulation 2.05 G, gain du récepteur 6.3.10⁵ temps de conversion 81.92 ms, constante de temps 81.92 ms. La plage de balayage était de 100 G avec une valeur de champ central de 3435 G.

Spectroscopie RAMAN

Nous avons retenu cette technique pour étudier l'homogénéité des dispersions solides élaborées et la distribution de l'Amphotéricine B au sein des matrices afin d'obtenir des informations sur l'état structural final à caractère cristallin ou amorphe. L'appareillage utilisé était un microscope Raman confocal [Lab Ram HR par Jobin-Yvon Horiba]. L'excitation de la diffusion Raman a été opérée par un laser He-Ne à une longueur d'onde de 632,8 nm. La résolution spectrale utilisée était de 2 cm⁻¹. L'analyse des spectres Raman des cristaux a montré un bon rapport signal sur bruit avec des temps d'intégration de 30 à 90 s. La durée de la collecte des données a été ajustée afin de minimiser le signal de fond. La résolution latérale spectrale sélectionnée était de 4cm⁻¹ pour une résolution latérale spatiale supérieure à 2 mm. Toutes les expériences ont été réalisées à une température ambiante.

Estimation de la taille des particules sèches obtenues par spray-drying par la technique de granulométrie laser

La mesure de la taille des particules a été effectuée à l'aide d'un granulomètre laser Malvern Mastersizer [Malvern Hydro 2000S]. L'heptane a été utilisé comme dispersant [indice de réfraction de 1,385-1,389 et indice de polarité de zéro]. Chaque échantillon a été dispersé dans de l'heptane et centrifugé à 2000 tr / min afin de réduire l'agrégation interparticulaire. La plage d'obscurcissement a été maintenue entre 10-20%. La taille moyenne des particules a été mesurée après avoir effectué l'expérience pour chaque lot sur trois échantillons.

Evaluation de la forme par microscopie à balayage électronique (MEB)

La microscopie électronique à balayage ou SEM (Scanning Electronic Microscopy) [modèle JEOL JCM-5000] est une technique basée sur l'étude des interactions électrons-matière qui permet d'analyser la surface des particules et d'évaluer la forme à travers des images de très haute résolution. L'instrument NeoScope a été utilisé pour l'étude à une tension accélérée comprise entre 10 et 15 kV. Des échantillons de poudre ont été collés sur un talon SEM avec un ruban adhésif conducteur et revêtu d'or pour réduire les charges électriques induites lors de l'analyse avec un NeoCoater MP-19020NCTR.

Analyse granulométrique par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Nous avons utilisé une technique spectroscopique appelée diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering : DLS) pour l'analyse granulométrique des liposomes à l'échelle submicronique afin d'évaluer leur diamètre moyen. L'appareil utilisé est de type nanocoulter N4MD (Beckman Coulter, Roissy Charles de Gaulle, France) avec pour conditions opératoires : une température ambiante ($T=20^{\circ}\text{C}$), un indice de référence de 90° , une viscosité égale à 0.899×10^{-3} Pa, et un indice de réfraction de 1,330.

Microscopie électronique à transmission par coloration négative

La caractérisation par microscopie électronique des liposomes, formulés à base de phosphatidylcholine d'œuf (EPC), de cholestérol et de céramides et encapsulant l'Amphotéricine B, a été obtenue en utilisant une technique de coloration négative. Les échantillons ont été incubés pendant 15 minutes à température ambiante dans une solution à 2% d'acide phosphotungstique. Une goutte de la préparation a été rapidement séchée sur une grille revêtue d'un film plastique à base de nitrate de cellulose et contenant du

carbone(Touzart & Matignon, Vitry-sur-Seine, France). Après séchage, les grilles ont été examinées à l'aide d'un microscope électronique (EM301, Philips, Amsterdam, Pays-Bas).

Modèle artificiel Duodénum-Estomac

Le modèle artificiel Duodénum-Estomac est un système de dissolution développé afin d'étudier le comportement d'un médicament dans un milieu mimant les conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal à savoir les mêmes conditions de pH, de flux dynamique gastro-intestinal ainsi que le transfert de masse. Ce système permet d'étudier le comportement d'un principe actif, sa dissolution et sa solubilisation dans un milieu passant d'un pH acide comme au niveau gastrique à un pH moins acide ou neutre comme au niveau duodénal(164).

Composition

La composition du milieu Estomac-Duodénum est préparée selon Carino et al.(164). Le milieu est initialement composé de 50mL de fluide gastrique à partir d'HCl entre [10^{-2} M et 10^{-5} M] et de 200mL de NaCl à 0.034M. Le compartiment du duodénum est constitué de 30mL de fluide intestinal (5mM de taurocholate de Na + 200mM de KCl dans 50mM de tampon phosphate à pH=6.5). Durant l'étude, le passage du fluide gastrique vers le compartiment de l'estomac et du fluide intestinal vers le compartiment du duodénum est effectué avec un flux de 2ml/min tout en maintenant le même volume dans chaque compartiment.

Synthèse des polymères de cyclodextrines

La synthèse des polymères de cyclodextrines est réalisée par un procédé de polycondensation par fusion selon la méthode brevetée de Mohamed Skiba (131). Les polymères de cyclodextrines solubles sont obtenus sous forme d'une solution qui est par la suite transformée en poudre par la méthode de séchage par atomisation ou méthode du spray-drying[spray-dryer B-290® BÜCHI, Flawil, Suisse].

Etude *in vitro* de la lyodisponibilité des dispersions solides amorphes à base de polymères decyclodextrines

L'étude de dissolution *in vitro* des différentes formulations à base d'AmB a été effectuée à l'aide d'un dissolutest Vankel type VK7000® [Varian Inc., Palo Alto, CA, USA]. Les

cuves contenaient un volume de 250ml de milieu de dissolution maintenu à une température de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ et mis sous agitation avec une vitesse de rotation des palettes à 75 rpm.

Les formulations préparées par spray-drying ont été testées dans différents milieux de dissolution discriminants et en respectant les conditions sink :

- un milieu de dissolution gastrique (pH=1,2)
- un milieu simulant le fluide biologique (165) ajusté à pH=7.4 et additionné d'un tensioactif : 0.1% de Dodécylsulfate de sodium (SDS).
- un milieu de dissolution pulmonaire (mSLF) préparé selon Marques et al. (165) avec une concentration de 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) à 0.02% et ajusté à pH=7.4

Une quantité de 2mL a été prélevée dans les cuves à différents temps entre 5 minutes et 360 minutes et remplacée par le milieu de dissolution afin de maintenir un volume total constant. Les échantillons ont été dilués, filtrés puis analysés par HPLC-UV à $\lambda = 405\text{nm}$ selon la méthode validée.

Evaluation de la distribution aérodynamique des particules solides par l'impacteur à cascades NGI®

L'évaluation de la distribution aérodynamique des particules solides par un impacteur à cascades permet de mimer la déposition pulmonaire dans le tractus respiratoire de particules solides inhalées en fonction de leur taille. L'évaluation *in vitro* des propriétés des particules sèches générées sous forme d'aérosol a été déterminée par l'appareil Next Generation Impactor NGI® Modèle 170 conformément aux spécifications sur les aérosols dans la Pharmacopée Américaine (USP). L'appareil NGI® utilisé est équipé de tamis d'insertion gravimétrique en acier inoxydable (MSP Corporation, Shoreview, MN, USA), couplé à un contrôleur de débit Copley TPK 2000 et connecté à un aspirateur Copley HCP5 (Copley Scientific, Royaume-Uni). Les débits d'air ont été mesurés et vérifiés avant chaque passage de poudre.

Trois gélules équivalentes à une masse unitaire d'AmB d'environ 7 mg ont été placées dans un dispositif d'inhalation DPI puis déversées dans l'impacteur NGI® par le dispositif Handihaler® dans des conditions de vide ($\Delta P = 4\text{ kPa}$, et un volume d'air = 40 L) avec un débit de 40 litres/min. Les différentes fractions récupérées ont été recueillies dans des tubes

d'hémolyse contenant 2 à 3 ml d'éthanol puis le solvant a été évaporé sous azote à $T=45^{\circ}\text{C}$. Les quantités déposées sur chaque filtre, correspondant au niveau de cascade donné de chaque compartiment (de 1 à 7), ont été stockées à $T=4^{\circ}\text{C}$ et analysées par chromatographie liquide selon la méthode déjà validée au niveau du laboratoire, afin de permettre d'établir la fraction respirable (RF), la fraction de particules fines (FPF) ainsi que la distribution de l'AmB au niveau des sept niveaux de cascades. Les diamètres définissant chaque niveau ont déjà été calibrés par le fabricant et correspondent aux valeurs suivantes:

Compartiment 1 (8,06 μm), Compartiment 2 (4,46 μm), Compartiment 3 (2,82 μm),
Compartiment 4 (1,66 μm), Compartiment 5 (0,94 μm), Compartiment 6 (0,55 μm),
Compartiment 7 (0,34 μm).

Travaux Personnels

Chapitre 1

Développement et caractérisation de liposomes d'amphotéricine B à base de céramides végétales pour une administration par voie orale

Resumé

Les céramides, une combinaison de sphingosine et d'acide gras, sont l'un des constituants des membranes cytoplasmiques cellulaires. Ils constituent un élément important dans la construction de la bicouche phospholipidique et maintiennent l'organisation de la barrière lipidique membranaire. De part leurs caractéristiques structurales, les céramides végétales associées à d'autres phospholipides dans une formulation de liposomes, pourraient conférer une certaine rigidité à la paroi liposomale et permettre ainsi une meilleure résistance vis-à-vis de l'activité des sels biliaires et des enzymes digestives après administration par voie orale.

Nous avons donc étudié diverses formulations de liposomes, à base de phospholipides phosphatidylcholine (PC) et cholestérol (CHO) associés ou non à des céramides végétales (CER). Les différentes formulations ont été étudiées dans un modèle artificiel «Estomac-Duodénum» mimant les conditions physiologiques afin d'étudier leur aptitude à résister aux sucs et enzymes digestifs et d'évaluer leur stabilité en vue d'une administration par voie orale.

Le diamètre initial moyen des liposomes, mesuré par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un nanosizer type Coulter®, est de l'ordre de 200 nm. Les variations de taille et l'intégrité structurale des vésicules dans l'environnement gastro-intestinal ont été évaluées. Nous avons noté une augmentation du diamètre moyen des vésicules pour toutes les formulations dès 30 minutes d'incubation dans le milieu digestif artificiel avec une augmentation plus marquée dans le compartiment duodénal. L'incorporation des céramides végétales dans les formulations de liposomes semble limiter ces variations de taille comparativement aux formulations sans céramides. De plus, pour toutes les formulations testées, l'intégrité structurale a été modifiée dans le milieu artificiel gastro-intestinal étudié.

Nous avons mis en évidence une variation de la concentration molaire en AmB des suspensions colloïdales entre les compartiments gastrique et duodénal après 2 heures :

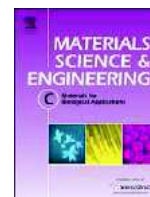
- une concentration molaire de 0,8 mM pour les liposomes à base de phosphatidylcholine de jaune d'œuf (EPC) sans céramides.
- Une concentration molaire de 0,25 mM et 0,35 mM respectivement pour les liposomes à base d'EPC/Céramides et liposomes à base de céramides seuls (CER).

Ces variations indiquent une diminution des concentrations molaires des formulations liposomales testées entre le compartiment « estomac » et le compartiment « duodénum » au cours du temps. La libération de l'AmB encapsulé dans les liposomes à base de EPC/CER est moins rapide que celle obtenue avec les liposomes à base d'EPC sans CER. Le temps de contact des vésicules avec les sels biliaires et enzymes digestifs pourrait être un facteur augmentant la « fuite » du principe actif. L'AmB encapsulé dans les liposomes de céramides semble être protégé pendant un temps plus long vis-à-vis de ces conditions drastiques et une corrélation pourrait être établie entre l'intégrité membranaire des liposomes préparés à partir de céramides et leur résistance à l'effet détergent des sels biliaires avec une libération ralentie du principe actif encapsulé.

D'autre part, l'association de phospholipides DSPC et céramides dans une formulation semble limiter les modifications de l'intégrité structurale des liposomes. En effet, nous avons noté que la variation de la concentration molaire au cours du temps n'excédait pas une valeur de 0,06 mM. L'incorporation de DSPC dans la formulation, même à des proportions plus faibles que celles des céramides, semble là encore influencer la stabilité des liposomes. Les effets des sels biliaires et des enzymes digestifs sur les liposomes « blancs » n'encapsulant pas d'AmB laissent supposer une relation avec la composition lipidique de la paroi liposomale. Les liposomes élaborés à partir de phospholipides caractérisés par une température de transition de phase élevée comme la DSPC, sont plus résistants que les liposomes à base d'EPC. Nous pourrions donc envisager d'étudier l'encapsulation de l'AmB dans des liposomes préparés à partir de DSPC du fait que nous obtenons une bonne stabilité des liposomes « blancs » de formulation CER:CHO:DSPC (rapport molaire 4:2:1) dans le milieu digestif artificiel.

Nous avons également étudié l'effet de la température sur les activités des sels biliaires et des enzymes digestifs. Nous avons évalué l'intégrité structurale des liposomes CER : CHO (rapport molaire 2 : 1) à 25°C et 37°C en suivant leur modification de taille. Bien que pour certains enzymes digestifs et sels biliaires, une activité maximale est obtenue à la température physiologique de 37°C, les résultats obtenus ne montrent pas un effet significatif des variations de température. L'AmB encapsulé pour chacune des formulations testées était bien protégé durant le passage à travers le compartiment gastrique puis libéré au niveau du compartiment duodéal. L'obtention d'une intégrité structurale de la paroi liposomale préservée et d'une libération ralentie de l'AmB au cours du temps pour les formulations à base de CER:CHO:EPC (4:2:1) nous permettent de conclure que les liposomes de céramides végétales sont plus adaptés à une administration par voie orale que les liposomes à base de

phospholipides de type phosphatidylcholine et pourraient permettre alors d'améliorer la biodisponibilité de l'AmB.



Development and characterization of oral liposomes of vegetal ceramide based amphotericin B having enhanced dry solubility and solubility

Malika Skiba-Lahiani^{a,*}, François Hallouard^a, Lyes Mehenni^a, Hatem Fessi^b, Mohamed Skiba^a

^a Laboratoire de Pharmaceutiques et Biopharmaceutiques, Faculté de Médecine et Pharmacie, 22 Boulevard Gambetta 76183 Rouen Cedex, France

^b Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, Equipe de Génie Pharmaceutique UMR 5007, CNRS, CPE, 43 Bd du 11 Novembre 69100 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 October 2014

Received in revised form 30 October 2014

Accepted 28 November 2014

Available online 2 December 2014

Keywords:

Amphotericin B

Vegetal ceramides

Liposomes

Oral administration

ABSTRACT

Despite the development of new antifungal, amphotericin B remains one of the most effective agents in the treatment of systemic fungal infections. Many patients exhibit nevertheless intolerance to amphotericin B at higher dosages and parenteral formulations present unlike per os ones, associated risks and high care cost. Free amphotericin B *per os* showed however an apparently poor absorption. In this study, we evaluate the potential of amphotericin B liposomes formulated with vegetal ceramides for oral administration. Ceramides, one of the constituents of cellular cytoplasmic membranes, constitute an important element in the construction and stability of their lipid bilayer. To fulfill this objective, vegetal ceramides, composed essentially of glucosylceramides, were firstly incorporated in various liposome preparations, entrapping or not amphotericin B, in comparison with phosphatidylcholine liposomes. Then, these preparations were introduced in an “Artificial-Stomach–Duodenum” model to improve their stability for oral administration. The formulation of amphotericin B liposomes containing ceramides presented a mean hydrodynamic size of about 200 nm. We showed also that cholesterol and phospholipids are required to prevent drug leakage and to obtain lamellar structure respectively. In “Artificial-Stomach–Duodenum” model, ceramides conferred to liposomes better membrane stability. In addition, ceramides did not alter their drug encapsulation yield being by 75%. This could be explained by the fact that ceramides as we proved, limited the detergent effect of bile salts on liposome membranes.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In developed nations, opportunist disseminated fungal infections are on the rise, affecting immunocompromised patients with e.g. cancer, organ transplant recipients or HIV/AIDS. In such patients, invasive fungal infections may account for as many as 30% deaths. Despite the development of new antifungal, amphotericin B remains one of the most effective agents in the treatment of systemic fungal infections. However, many patients exhibit intolerance to amphotericin B, particularly at higher dosages [1]. The most serious adverse reaction reported with amphotericin B therapy is nephrotoxicity with sodium depletion [2,3]. A variety of parenteral formulations consisting of encapsulate drug in different vesicles have been studied to prevent these side effects [4–7]. Entrapping amphotericin B in liposomes or various lipid formulations seems to be the best strategy to reduce amphotericin B nephrotoxicity and improve drug delivery to target sites [8,9]. While effective, the limitations of amphotericin B parenteral administrations are the safety issues associated with this administration (e.g. infections of the

indwelling catheter or patient chills and shaking due to erythrolysis) and high drug cost.

An oral formulation of amphotericin B is desirable to treat infections and provide or prophylactic therapy for high-risk patients. This route will also increase compliance and prevent parenteral side effects. Free amphotericin B *per os* showed however an apparently poor absorption [10]. Recently several oral formulations were described such as amorphous drug nanoparticles [11], carbon nanotubes [12], chitosan microparticles [13], cubosomal nanoparticles [14], nano-emulsions [15], gelatin nanoparticles [16], polymeric nanoparticles [17] or solid lipid nanoparticles [18].

Liposomes could also be an interesting solution. Indeed, this vesicle is reputed to have high loading capacity for hydrophobic drug, and by appropriate choice of particle size and surface characteristics, some degree of selectivity is possible [19]. Therefore, incorporation of amphotericin B into liposomes will alter its pharmacokinetic profile leading to changes in tissue distribution, antifungal activity and importantly, tolerability. Unilamellar and multilamellar vesicular structures can be formed from a variety of materials such as amphiphathic lipid substances including e.g. saturated and unsaturated fatty acids or synthetic ionic and nonionic surfactants [20]. The vesicles, fabricated from these materials, particularly when combined with cholesterol, can entrap hydrophilic and lipophilic drugs. Lopez-Berestein et al. were the first to

* Corresponding author at: Université de Rouen, Faculté de Pharmacie/Médecine, Laboratoire de Galénique 22, Boulevard Gambetta, F-76183 Rouen, France.
E-mail address: malika.skiba@univ-rouen.fr (M. Skiba-Lahiani).

Chapitre 2

Etude des interactions de l'Amphotéricine B dans la matrice liposomale par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par résonance paramagnétique électronique (RPE)

Resumé

Dans le cadre de ce travail, nous avons préparés des liposomes à base de Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) et de Dimyristoylphosphorylglycerol (DMPG) pour l'encapsulation de l'AmB. Ces 2 phospholipides, adaptés pour une administration par voie pulmonaire, ont été retenus en tant que modèle membranaire pour cette étude de caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par résonance paramagnétique électronique (RPE).

L'assemblage des deux phospholipides DMPC et DMPG dans une seule structure et avec un rapport équimolaire (DMPC :DMPG :AmB) (1 :1 :1) parvient à donner des résultats intéressants en terme de solubilisation de l'AmB (environ 50%) comme démontré par la bonne résolution des spectres RMN obtenus qui montrent des propriétés de fluidité et de mobilité membranaire aussi bien pour les liposomes de petite taille (entre 20-100nm) en bicouche unilamellaire (Small Unilamellar Vesicles :SUV) que pour les liposomes multilamellaires (Multilamellar Vesicles :MLV) d'une taille supérieure à 500nm. Le phospholipide DMPG, un composant lipidique spécifique du fluide pulmonaire, permettrait un meilleur ciblage lors d'une éventuelle administration pulmonaire. L'étude des interactions entre les composés de ces systèmes est importante pour l'évaluation thérapeutique de la molécule active, mais aussi pour déterminer le degré ou l'état d'aggrégation de l'AmB, facteur déterminant pour son aptitude à passer les barrières membranaires, pour son efficacité ou encore pour sa toxicité potentielle.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

NMR and ESR study of amphotericin B interactions with various binary phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol membranes



J.C. Debouzy^{a,b,1,*}, L. Mehenni^{c,1}, D. Crouzier^{a,b}, M. Lahiani-Skiba^c, G. Nugue^a, M. Skiba^c

^a Institut de Recherches Biomédicales du Service de Santé des Armées, 91223 Breteuil, France

^b CLIMATEC, centre de recherche biomédicale Edmond J. Safran, commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, 17 rue des Martyrs, 38000 Grenoble, France

^c Normandie Université, univ Rouen, Lab Pharmacie Galénique, DC2N INSERM U 982, 22 Bd Gambetta, 76183 Rouen, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2016

Received in revised form 13 February 2017

Accepted 13 February 2017

Available online 16 February 2017

Keywords:

Solubilization

Amphotericin B

DMPC

DMPG

Phospholipids ratios

Formulation

NMR

ESR

Membranes

ABSTRACT

Several biologically relevant phospholipids are considered as potential excipients for IV administration liposome's formulation of AMB (Biopharmaceutics Classification System Class IV). On the basis of *in vivo* bioavailability studies, DMPC and DMPG were ranked as the first potent encapsulation enhancers for this model drug, especially if one expects to target DMPG rich systems as pulmonary surfactant. Subsequently, dispersions (multilayers) of DMPC, DMPG or in binary systems with various molar ratios were prepared with or without AMB (molar ratios AMB/lipid) and further investigated using the ¹H-, ³¹P-NMR methods. It was found that equimolar preparations of DMPG/DMPG exhibited both a good encapsulation of AMB, while also probably able to target pulmonary surfactant. Besides DMPG did not exhibit the same solubilization properties. Conversely, no targeting by DMPC dispersion alone was expected, even if a good solubilization was obtained.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polyene macrolide amphotericin B (AMB, Fig. 1) is a well-known antifungal agent. Due to a very low rate of resistance (especially against systemic candidiasis) AMB has been extensively clinically used since the early 60's (Tilley, 1962). Despite more than half a century of intensive study, the mechanisms of action and toxicity of AMB are still not completely understood (Barwicz et al., 1992). The selective affinity of AMB for membrane sterols have been early identified (Baginski et al., 2002; Khutorsky, 1992): with cholesterol of eukaryotic cells, leading to haemolytic activity/toxicity; with ergosterol, the fungal sterol, by forming the ionophoric structures involved in the antifungal activity. However, even the most basic components of the leading model remain unclear, including the structure/function relationships that underlie channel self-assembly (Baginski et al., 1997; Ernst et al., 1981) the importance of AMB/phospholipid interactions. The role of membrane sterols in forming ion channels and even whether the channel formation is

causatively linked to antifungal activity (Andreoli, 1974; Brajtburg et al., 1990; Baginski et al., 1997, 2002; Umegawa et al., 2007). AMB is very hydrophobic (LogP = -2.3 (DrugBank, 2014)), almost insoluble in aqueous solution and thus requiring a vehicle (carrier) before any use in the treatment of systemic mycosis. Also, AMB toxicity, mainly hemolytic activity and nephrotoxicity, has been soon related with its self-aggregation properties, leading to research dispersions methods *in vivo* (Barwicz et al., 1992). Such properties were obtained, for instance, by using detergents (e.g. deoxycholate and buffer, to form the commercial preparation FUNGIZONE[®]). Organic solvents have also been tested, whereas their use was severely limited by cellular toxicity. Synthetic membrane systems (liposomes, i.e. uni or multi-lamellar phospholipid bilayers) entrapping AMB, that exhibited less toxicity and enhanced dispersion, were used in the treatment of murine histoplasmosis (Taylor et al., 1988), cryptococcosis (Graybill et al., 1982), and candidiasis (Lopez-Berestein et al., 1983). Liposomal AMB was shown to be more effective than free AMB. Furthermore, clinical studies and trials performed on cancer patients with fungal infections showed that liposomal AMB was better tolerated than Fungizone[®], and could be used at higher amounts, thus giving a better effectiveness (Lopez-Berestein et al., 1987, 1985). In fact, the term liposomal vesicle is a very unprecise and coarse definition.

* Corresponding author at: Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 91220 Breteuil-sur-Orge, France.

E-mail address: jcddebouzy@gmail.com (J.C. Debouzy).

¹ Similar contribution.

Chapitre 3

Préparation et caractérisation de microsphères d'Amphotericine B obtenues par la méthode de séchage par atomisation

Resumé

Le concept d'élaborer des dispersions solides amorphes sphériques à partir de polymères de cyclodextrines innovants (Poly-CD) constitue une nouvelle approche pour le développement d'une formulation à visée thérapeutique et aboutit à une 4^{ème} génération de dispersions solides (DS 4.0). Le procédé de synthèse pour l'obtention de polymères de cyclodextrines originaux, tel que décrit par Skiba et al.(131), est simple, rapide et n'utilise aucun solvant organique. La polymérisation des cyclodextrines naturelles est obtenue par une réaction de polycondensation par une méthode de fusion. Le caractère non toxique, biodégradable et biocompatible de ces polymères de cyclodextrines permet leur utilisation dans le domaine pharmaceutique.

Dans ce travail expérimental, nous avons préparé des poudres à base de monomères AmB élevées en charge [15% [w / w]] comparativement aux liposomes. Les dispersions solides amorphes sphériques obtenues sous forme de poudre sèche ont conduit à une nette amélioration du profil de dissolution [100% à 40 minutes à pH = 7,4] de part l'augmentation de la solubilité et de par la réduction de la taille des particules permettant une bonne mouillabilité en solution. En outre, une libération contrôlée peut être obtenue par cette 4^{ème} génération de dispersions solides amorphes (166). Les propriétés physico-chimiques et le comportement de l'AmB dans la matrice polymérique ont été démontrés par diverses approches. La spectroscopie infrarouge nous donne une prédiction de l'interaction entre le polyène et les unités glucopyrannose des cyclodextrines. L'inclusion d'AmB dans les cavités des cyclodextrines a été étudiée par l'analyse TGA. Cette inclusion a été confirmée à la fois [i] par les faibles quantités d'eau présentes dans les formulations séchées par atomisation en raison de la substitution des molécules d'eau dans la cavité interne des CD et [ii] par la diminution de la cristallinité de l'AmB obtenue avec les polymères de cyclodextrines, mise en évidence par les techniques spectroscopiques Raman et Infrarouge, et par DSC. L'amorphisation de l'AmB est vraisemblablement la résultante de son interaction avec les polymères de cyclodextrines (Poly- γ -CD) de type dipôle-dipôle et sans création de liaisons covalentes car la libération du médicament reste facilitée par la matrice binaire.

L'utilisation de la technologie des dispersions solides amorphes sphériques (DS 4.0), impliquant l'utilisation de polymères de cyclodextrines comme seul excipient inerte aux propriétés à la fois complexante et solubilisante, conduit à l'obtention d'une formulation médicamenteuse à base d'AmB, aussi bien adaptée à une administration par voie orale qu'à une utilisation sous forme d'aérosols secs pour une inhalation par voie pulmonaire.

Article

Preparation and Characterization of Spherical Amorphous Solid Dispersion with Amphotericin B

Lyes Mehenni ¹, Malika Lahiani-Skiba ¹, Guy Ladam ², François Hallouard ¹ and Mohamed Skiba ^{1,*}

¹ UFR of Health, Laboratory of Pharmaceutical & Biopharmaceutical technology, Inserm U1239, UNIROUEN, Normandy University, 76183 Rouen CEDEX, France; lyesmehenni@yahoo.fr (L.M.); malika.skiba@univ-rouen.fr (M.L.-S.); francois.hallouard@gmail.com (F.H.)

² PBS (UMR 6270), CNRS, UNIROUEN, Normandy University, 27000 Evreux, France; guy.ladam@univ-rouen.fr

* Correspondence: mohamed.skiba@univ-rouen.fr; Tel.: +33-2-3514-8596

Received: 15 October 2018; Accepted: 13 November 2018; Published: 16 November 2018



Abstract: In the present study, new polymer microspheres of amphotericin B (AmB) were prepared by a spray drying technique using cyclodextrin polymers (Poly-CD) to improve the solubility and dissolution of AmB, to prevent in vivo toxic AmB aggregations. Formulations were characterized through scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), differential scanning calorimetry (DSC), thermal analysis, Raman spectroscopy, particle size, drug purity test and in vitro release studies. The analysis indicated that the chemical structure of AmB remained unchanged in the amorphous solid dispersion, but the structure was changed from crystalline to amorphous. AmB was completely release from such optimized formulations in dissolution media in 40 min. This work may contribute to a new generation of spherical amorphous solid dispersion using a cyclodextrin polymer, which has implications for the possibility of drug development for oral utilization or as powder aerosols for pulmonary administration.

Keywords: amorphous solid dispersions; amphotericin B; cyclodextrins polymers; spray-drying

1. Introduction

Amphotericin B [AmB] is considered as an old drug with antifungal properties. This active pharmaceutical ingredient was extracted from *Streptomyces nodosus* and its chemical synthesis was discovered in 1970 [1]. In medicine, AmB is used for the treatment of deep or systemic fungal development induced by an immunosuppressive state of patient which is one of the major causes of mortality [2].

AmB belongs to class IV in the Biopharmaceutical Classification System, presenting low solubility (about 1 µg/mL in water) and low membrane permeability [3]. This low solubility is due to the self-association of AmB molecules above a critical micellar concentration at about 0.2 mg/mL [4]. The long polyene chain measuring 21 Å is responsible for the high absorption between 300 and 450 nm allowing its dosage using an ultra-violet [UV] spectrophotometer.

Recently, several formulations were described to enhance AmB solubility, such as amorphous drug nanoparticles [5], carbon nanotubes [6], chitosan microparticles [7], cubosomalnanoparticles [8], nano-emulsions [9], gelatin nanoparticles [10], polymeric nanoparticles [11], solid lipid nanoparticles [12] or liposomes [13].

The marketed available preparations of AmB are AmBisome[®] and Fungizone[®]. These preparations are indicated for the intravenous route and Fungizone is also indicated per os. However, the high interaction of AmB molecules with plasma proteins induces nephrotoxicity [14]. Hepatotoxicity was also

described at therapeutic doses corroborating with aggregated states of AmB: dimeric or poly-aggregated forms. These aggregated states of AmB depend on different formulation factors such as pH and the presence of some excipients [15,16].

To prevent in vivo toxic aggregated forms, the use of cyclodextrins [CD] or derivatives seems interesting. Indeed, CDs have the ability to form inclusion complexes in their inner cavity with host molecules preventing aggregation. CD and their derivatives are also known to be efficient solubilizing agents [17]. CD-based polymers [Poly-CD] were developed in order to increase the solubility of natural CD or derivatives [18]. In addition, natural CD or Poly-CD as solubilizing agents are considered as safe for a pharmaceutical use because of their non-toxic composition, mainly based on glucose units.

A new approach is essential to implement the large capacity of this antifungal drug. To avoid the conventional routes of administration and to enhance the local drug bioavailability, another alternative is found by inhalation AmB particles to target local action in the lungs. A recent study has showed interest in using a pulmonary route for administering microparticles and lipid complexes [19]. The results showed a good pulmonary deposition and a lower rate of active substance in the kidney leading to a reduction of drug nephrotoxicity and an improvement of fungal activity, approximately 1.5-times better than the marketed intravenous preparations. Pharmacokinetic and organ distribution studies showed that the pulmonary administration may be favorable for a good efficiency by local action [19].

The aim of this work is to design and evaluate in vitro original formulations of AmB based on cyclodextrin or derivatives for lung administration.

To reach a targeted release, the design of amorphous solid dispersions using Poly-CD will be studied.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Materials

Amphotericin B as active pharmaceutical ingredient was purchased by Quimdis (Levallois-Perret, France). Natural α -cyclodextrins (α -CD), β -cyclodextrins (β -CD) and γ -cyclodextrins (γ -CD) were provided by Wacker (München, Germany) and permethylated β -CD [PM β -CD] by Roquette (Lestrem, France). Homopolymers, terpolymers and tetrapolymers of CD, were acquired from start-up In-Cyclo (Rouen, France). The surfactant Sodium Lauryl Sulfate (SLS) was obtained from VWR (Radnor, PA, USA). All other chemicals and the reagents were commercially available products of analytical grade.

2.2. Amphotericin B Determination-HPLC/UV Method

AmB was analyzed, isolated and quantified using an HP 1100 series chromatographic system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a binary pump, an auto sampler and a diode array detector with a detection wavelength set at 405 nm. The separations were performed on a base-deactivated reversed phase Purospher[®] Star RP-C₁₈ column (Merck Chemicals, Belgium). The elution was realized by a mobile phase composed of MeOH/Acetonitrile /EDTA 0.25 mM buffer (40:30:30) (*v/v/v*), running at a flow rate of 1 mL/min. The injected volume was 10 μ L and the column temperature was set at 25 °C during the analysis time. The LC-method was used for the solubility and lyodisponibility studies of the pure drug and the different matrix loaded with AmB.

2.3. Synthesis of Homopolymers, Terpolymers and Tetrapolymers of CD

Cyclodextrin polymers were synthesized by using a direct melt polycondensation process according to the method reported by Skiba [18]. Briefly, a mixture of known amount (*w/w*) of cyclodextrins (α , β , γ or per-methyl β), citric acid and sodium phosphate dibasic was transferred into a reactor which was maintained at temperature ranging between 140 °C and 150 °C for fixed time. The obtained solid form was dissolved in water and dialyzed using polyether sulfate membrane filter

with molecular weight cut off of 10,000 Da. After the dialysis, the resulted solution was spray-dried with a Mini Spray Dryer B-290[®] (BÜCHI, Flawil, Switzerland).

2.4. Phase Solubility Studies

The experiments were in accordance to Higuchi & Connors [20] to evaluate the interactions between AmB and the cyclodextrin entity in terms of solubility. The different Poly-CD: Poly γ -CD (homopolymers), Poly $\alpha\gamma$ -CD and Poly $\beta\gamma$ -CD (terpolymers) and Poly $\alpha\beta\gamma$ -CD (tetrapolymers) were solubilized in flask that containing 5 mL of distilled water. An excess amount of AmB was added in the saturation limit. The yellow-orange suspensions were magnetically stirred at 600 rpm at $T = 37 \pm 2$ °C for three days and centrifuged at 10,000 rpm by Eppendorf 5800 Centrifuge (Hamburg, Germany). Finally, the supernatant fluid was filtered (0.2 μ m) and analyzed by HPLC. The concentration range was between 25 and 1000 mg/mL for Poly-CD in accordance to their higher limit solubility which fixed at 1.2 g/mL [17].

2.5. Preparation of Amorphous Solid Dispersions

A Büchi 290 nozzle type mini spray-dryer (Flawil, Switzerland) was used for the preparation of AmB-loaded spherical amorphous solid dispersions. The cyclodextrin polymers used as homopolymers poly γ -CD, terpolymers poly $\alpha\gamma$ -CD and poly $\beta\gamma$ -CD and tetrapolymer $\alpha\beta\gamma$ -CD are retained because of their greater ability to solubilize AmB and based on the results of phase solubility studies. The conditions of spray-drying were determinate by an optimization within the laboratory.

Amorphous solid dispersions were prepared with Poly-CD dissolved in 270 mL of deionized water (DW). The AmB powder was solubilized in 30 mL of methanol and sonicated for 10 min. The yellow and cloudy solution of AmB was added in polymer aqueous solution and stirred mechanically for 15 min to allow a better dispersion of AmB in the mixture. The amorphous solid dispersions with AmB content (approximately 1%, 7%, 15%) were prepared by spray-drying. The same method was used to prepare inclusion complexes based natural γ -CD.

The amorphous solid dispersions were prepared from a lower AmB loading concentration than the equilibrium solubility of AmB in cyclodextrin polymers. The solutions were spray-dried with solution feed rate of 4 mL/min and outlet temperature of 130 °C. The inlet temperature was observed in the domain of 75–80 °C. The pressure of the aspirator filter vessel was maintained between P values of –50 and –40 mbar.

The formed solution or suspension was left under magnetic stirring throughout the process of atomization by spray-drying. A homogeneous powder was obtained at the end of the process.

2.6. Drug Loading and Entrapment Efficiency

The dosage of AmB in the different formulations was carried out by HPLC to estimate the amount present in each powder and to determine the efficiency of the atomization process. Besides, the homogeneity of AmB distribution in the matrix was verified by a triplicate analysis of the powder samples ($n = 3$). An equivalent of 50 mg of AmB were solubilized in 5 mL DMSO and completed to 100 mL by a mixture contained (H₂O:methanol) (80:20) (v/v). The solution was sonicated and filtered through 0.45 μ m PVDF, diluted and analyzed by HPLC.

2.7. Evaluation of Aggregated States of AmB by Spectrophotometry UV

An equivalent of 1 mg of AmB was prepared from the amorphous solid dispersions (Poly γ -CD:AmB) in distilled water to obtain a concentration of 10 μ g/mL, and analyzed by UV-1600PC UV/vis spectrophotometer (VWR, Radnor, PA, USA) using a quartz cell in the range of 300–450 nm. The same concentration of cyclodextrin polymers (Poly γ -CD) without AmB was used as blank. The UV spectrum of AmB pure drug, and AmB in polymeric matrix were compared with literature and marketed formulations.

2.8. Differential Scanning Calorimetry Property

Differential scanning calorimetry (DSC) was performed using DSC6[®] (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). An empty aluminum pan was used to calibrate the apparatus. Samples (containing 5 mg of amphotericin B) were accurately weighed into aluminum pans and sealed. Sample thermograms were obtained at a scanning rate of 10 °C/min conducted over a temperature range of 30–250 °C under a nitrogen gas (30 mL/min). The apparatus was controlled by the Pyris[®] software (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Measurements were performed in triplicate.

2.9. Thermal Analysis

Mass losses were recorded with 4000[®] (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) on 5 mg samples in open pans at the heating rate of 10 °C in the 30–700 °C temperature range under a nitrogen gas flow (20 mL/min). All measurements (AmB pure drug, Poly-CD, Physical mixture and amorphous solid dispersions) were performed in triplicate.

2.10. Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FT-IR)

The interaction of AmB with natural CD and Poly-CD in the solid state from dried samples were studied by infrared spectroscopy. FT-IR spectra were recorded on an IR spectrophotometer from PerkinElmer equipped with an ATR, in the range between 4000 cm⁻¹ and 700 cm⁻¹ at a resolution of 8 cm⁻¹ and with 20 scans. All measurements were performed in triplicate.

2.11. Raman Spectroscopy Property

Raman analyses were carried out by using a confocal Raman microscope (Lab Ram HR by Jobin-Yvon Horiba, Kisshoin, Minami-ku Kyoto 601-8510, Japan). The excitation of Raman scattering was operated by a He-Ne laser at a wavelength of 632.8 nm. The spectral resolution used was 2 cm⁻¹. Raman spectra of the crystals with good signal-to-noise ratio was obtained with integration times from 30 to 90 s and the duration of the data collection was adjusted in order to minimize the background signal. The selected spectral lateral resolution was 4 cm⁻¹ for a spatial lateral resolution better than 2 mm. All experiments were carried out at room temperature.

2.12. Particle Size Analysis

The measurement of particle size was performed using Malvern Mastersizer (Malvern Hydro 2000S, Grovewood Road Malvern WR14 1XZ, United Kingdom). Heptane was used as a dispersant (refractive index of 1.385–1389 and polarity index of zero) [21]. Each sample was dispersed in heptane and stirred at 2000 rpm in order to reduce the interparticle aggregation. The obscuration range was maintained between 10–20%. The average particle sizes were measured after performing the experiment for each batch in triplicate.

2.13. Scanning Electron Microscopy (SEM)

A Scanning electron microscopy (model JEOL JCM-5000, Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan), NeoScope instrument was used for the study at an accelerated voltage between 10 and 15 kV. Powder samples were stuck on SEM stub with conductive adhesive tape and coated with gold to reduce electric charges induced during analysis with a NeoCoater MP-19020NCTR.

2.14. In Vitro Dissolution

In vitro dissolution studies of pure drug and solid dispersions prepared by the different methods were evaluated using Vankel VK 7000[®] dissolution system (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). The rotation speed was 75 rpm and the temperature were adjusted at 37 °C ± 0.5 °C.

The drugs prepared by spray-drying were tested in two different media with 0.10% (*m/v*) of SLS. The first was an acid medium at pH = 1.2 for the prediction of release capability in vivo using

simulated gastric medium. The second was at pH = 7.4 having a similarity with simulated body fluid [22]. The composition of both dissolution media was:

Dissolution medium [1]: 7 mL of HCl (37%) was added in a 1-L flask containing 500 mL of water. 2 g of NaCl was added and the volume was completed to 1000 mL with H₂O and pH adjusted to a value of 1.2 with HCl 0.1 M.

Dissolution medium [2]: the components described in Table 1 were simultaneous solubilized in 500 mL of H₂O, the volume was completed to 1000 mL with H₂O and pH adjusted to a value of 7.4 with HCl 0.1 M. The equivalent of 5 mg of AmB was predetermined and dissolved into vessels containing 250 mL of dissolution medium in compliance with sink conditions. SLS was selected as detergent for the dissolution test because of his strength ionic power in saline solution.

Table 1. Dosage (%) and mean diameter particles of amphotericin B drug (AmB), and different spray-dried formulations: solid dispersions (SD), γ -cyclodextrin based polymers (Poly γ -CD) and $\alpha\gamma$ -cyclodextrin based polymers (Poly $\alpha\gamma$ -CD). 95% limits mean the limits of size of 95% of the particle populations.

Formulations/(% MeOH)	Dosage (%)	Mean Diameter (nm)	Sd (nm)	95% Limits (nm)	Indice of Polydispersity
Amphotericin B	-	7090	370	5560–8630	1.6
AmB spray-dried (sd)/10%	-	11,200	605	8130–14200	1.4
AmB spray-dried (sd)/50%MeOH	-	19,500	643	12,500–2,6500	0.8
SD (Poly γ -CD/AmB) (100:20)/10%	13.72%	1170	46	1060–1270	1.2
SD (Poly γ -CD/AmB) (100:10)/10%	5.19%	688	24	641–734	1
SD (Poly γ -CD/AmB) (100:10)/30%	5.39%	1820	52	1620–2020	1.1
SD (Poly $\alpha\gamma$ -CD/AmB) (100:20)/10%	13.17%	3620	106	3060–4190	1.2
SD (Poly $\alpha\gamma$ -CD/AmB) (100:1)/10%	5.27%	1550	47	1400–1710	1.2
SD (Poly $\alpha\gamma$ -CD/AmB) (100:10)/50%	8.37%	5640	221	4550–6730	1.2
SD (Poly γ -CD/AmB) (100:10)/50%	8.36%	5450	218	4420–6490	1.2

In all experiments, 2 mL of dissolution sample was withdrawn at 5, 10, 20, 30, 45, 60 and 90 min and replaced with an equal volume of the fresh medium supplemented with 0.1% or 0.02% SLS to maintain a constant total volume. Samples were filtered through 0.20 μ m and assayed for drug content at 405 nm by UV spectrophotometry. The dissolution tests were conducted in triplicate ($n = 3$). Cumulative percentages of dissolved drug from preparations were calculated using calibration equations.

3. Results and Discussion

3.1. Drug Solubility Study

The first step for the design of a potential efficient formulation based on the use of cyclodextrins is to determine the impact of cyclodextrins or their derivatives on AmB solubility. A HPLC/UV method was developed and validated in terms of specificity, precision, accuracy and linearity. The analytical method proved to be linear over the concentration range of (0.5–50) μ g/mL on three days ($n = 9$)

in agreement with ICH guidelines (ICH-Q1-R2) [23] The chromatographic separation was obtained at 12 min. using the described method and the chromatographic parameters were summarized in Figure 1.

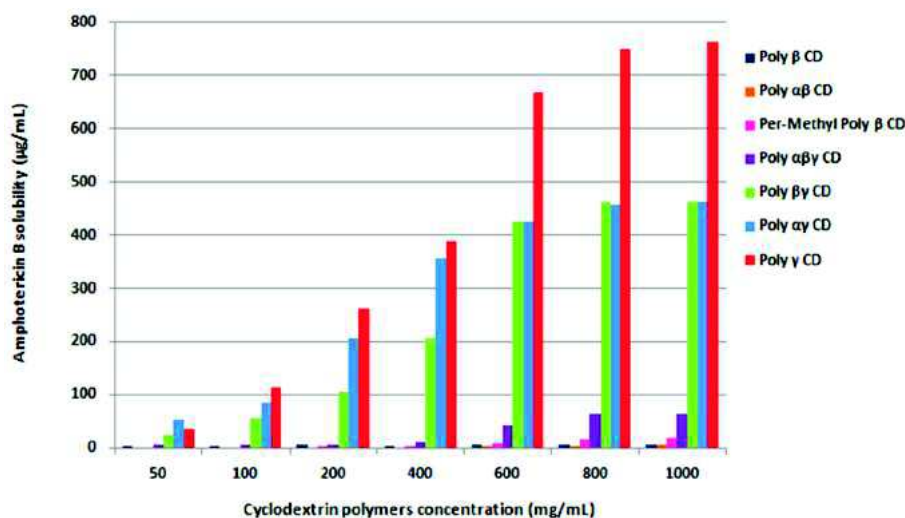


Figure 1. Solubility diagrams of AmB in presence of cyclodextrin polymers at 37 °C ($n = 3$).

To complete this study, we determined the influence of cyclodextrin-based polymers (Poly-CD) and their composition on AmB solubility. Initially, Poly γ -CD, Poly β -CD and Poly-per-methyl β -CD (cyclodextrin homopolymers), Poly $\alpha\beta$ -CD, Poly $\alpha\gamma$ -CD and Poly $\beta\gamma$ -CD (cyclodextrin terpolymers) and Poly $\alpha\beta\gamma$ -CD, Poly $\alpha\beta\gamma$ -CD chitosan polymers (cyclodextrin tetrapolymers) were synthesized according to the organic solvent-free method reported by Skiba et al. [18]. We tested a lot of different Poly-CD, because drug interactions with such polymers could interact through inclusion in cyclodextrin cavities but also through polymer adsorption or inclusion in cavities between polymer ramifications. Thus, it is difficult to extrapolate that the best inclusion complexation with a determined native cyclodextrin leads to the best complexation with its polymerized form. From results of AmB solubility studies, Poly γ -CD showed the best enhancement with an increase of AmB solubility multiplied by a factor 127 to reach 761 $\mu\text{g}/\text{mL}$. An important interaction was also observed between polyene and terpolymers (Poly $\alpha\gamma$ -CD and Poly $\beta\gamma$ -CD) increasing the solubility to 463 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 461 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Only with polymers containing γ -CD in their composition as Poly $\alpha\beta\gamma$ -CD, a minor improvement of AmB solubility was remarked, while no improvement was shown using other Poly-CD: Poly $\alpha\beta$ -CD, Poly α -CD, Poly β -CD or poly per-Me β -CD. The solubility of AmB molecules was significantly increased only when γ -CD were mostly used as complexing agent. Poly-CD are high hydrophilic polymers without hydrophobic block [19]. There are, thus, no amphiphile substance such as PEG-PLGA allowing the formation of micelles to improve the solubility of AmB [24]. The core of CD has hydrophobic properties but the outside of CD is high hydrophilic due to their -OH functions. This explains why these results demonstrate that increasing solubility was a consequence of more interactions through hydrogen bonds leading to inclusion complexation in cyclodextrin cavity. An easy substitution of water molecules by AmB is due to the polar–apolar energy through hydrogen bonds or Van der Waals interactions and to the reduction of intermolecular interactions responsible for low solubility. This could also be due to the esterification of AmB hydroxyl, amine or carboxyl group by the presence of citric acid within the polymeric structure [17].

3.2. Characterization of Designed Formulations

Several characterizations of the different designed formulations were performed and compared to AmB free form in order to better understand the influence of formulation on physico-chemical properties and interactions between γ -CD (or derivatives) and AmB.

3.2.1. Amphotericin B Content

The quantification of AmB within the different formulations using chromatographic validated method was given in the Table 1, as well as the mean diameter of powders. All the formulations prepared by spray-drying were found to be monodisperse. Drug content ranged from 90.0% to 100.0% with a homogeneous distribution of AmB in the powder ($n = 3$). Low coefficient of variance (CV) values ($<1.0\%$) in drug content indicates the reproducibility of the technique employed for the preparation of solid dispersion (SD). The spray-dried powders were produced at different yields where the mass quantities found were higher than 45%.

3.2.2. Morphology and Particle Size Analysis

The results are summarized in Table 1. The particles of free form AmB have an average size in the micrometer range, 6–8 μm . By comparison, the average size of AmB particles obtained from a spray-dried water–methanol solution was between 8 and 26 microns. This size difference could be due to the limited solubility of AmB in methanol/water mixture, resulting in agglomeration of AmB molecules. Size comparison between the different formulations containing CDs polymers shows that the formulations based on γ -CD homopolymers have a smaller average size that can enhance their wettability. PDI values >1 indicate a polynomial population of particles which can be explained by the presence of free amphotericin B in micelle form.

In Figure 2 shows SEM micrographs of spherical amorphous solid dispersions, revealed clear changes in the morphology of powder particles with evident formation of spherical amorphous solid dispersions.

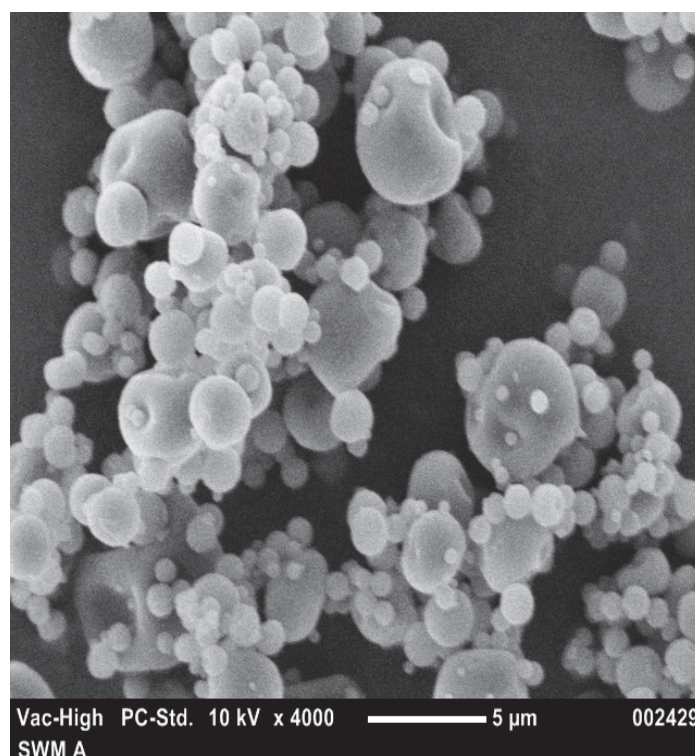


Figure 2. SEM photomicrograph of AmB spherical amorphous solid dispersions.

3.2.3. Differential Scanning Calorimetry Analysis

The Differential Scanning Calorimetry (DSC) curve of free form AmB showed a sharp endothermic peak at $T = 174\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponding to its melting point and suggesting its crystalline nature, followed by a glass transition temperature (T_g) at $T = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ [25]. However, in the physical mixture, a double pic can be observed: one corresponding to the polymer and one indicating a presence of crystalline form of

amphotericin B. This second pic is displaced towards a lower temperature and the broadening can due to a weak interaction. Concerning the thermal comportment of AmB, a new peak of solid dispersion appeared corresponding to a new entity formed as a consequence of the interaction between AmB and γ -CD polymeric network and cavities (Figure 3).

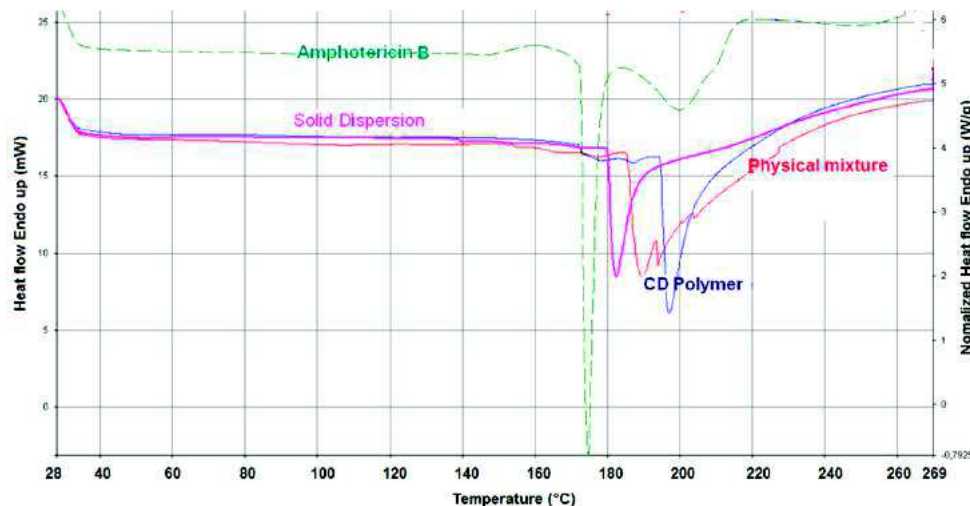


Figure 3. Thermograms of spray-dried amphotericin B (green), uncharged γ -cyclodextrin based polymer (blue), solid dispersion with AmB (purple) and physical mixture of γ -cyclodextrin based polymer with AmB (red).

The disappearance of the AmB endothermic peak was a strong evidence of an amorphous transformation that is favorable to rapid bioavailability during in vivo drug release.

3.2.4. Thermal Analysis

The thermal analysis of solid dispersion is shown in Figure 4. AmB showed critical weight loss that is stabilized around 600 °C. This is probably related to the decomposition of AMB structure. The lost weight indicates the loss of water molecules included in CD cavities. Poly γ -CD presented three stages of weight loss. The weight loss percent for amphotericin B (AmB), physical mixture and solid dispersions (SD) based AmB and γ -cyclodextrin polymers (Poly γ -CD) were given in Table 2. Previous studies have reported the presence of water molecules, depending on the relative humidity in CDs [26]. For the spherical amorphous solid dispersion, the thermogram was different from the pure materials. This demonstrated the occurrence of interactions between the drug and carriers leading to the formation of new system. This present study also showed that the dehydration pattern of solid dispersion was different from the thermal behavior of pure CD and physical mixture. The percentages of water evaporation decreased when the complex was formed, this fact could be explained by the substitution of water molecules by AmB in one hand, and by the solid dispersion method itself that eliminate host water molecules, in other hand.

Table 2. Weight loss in percent of amphotericin B (AmB), physical mixture and solid dispersions (SD) based AmB and γ -cyclodextrin polymers (Poly γ -CD) calculated from the dehydration step of thermal analysis.

Analyzed Products	Dehydration Step	
	Temperature Range (°C)	Weight Loss (%)
Amphotericin B	30 – 105	3.40
Poly γ -CD	30 – 105	5.69
Physical Mixture	30 – 105	5.60
SD [Poly γ -CD/AmB]	30 – 105	1.87

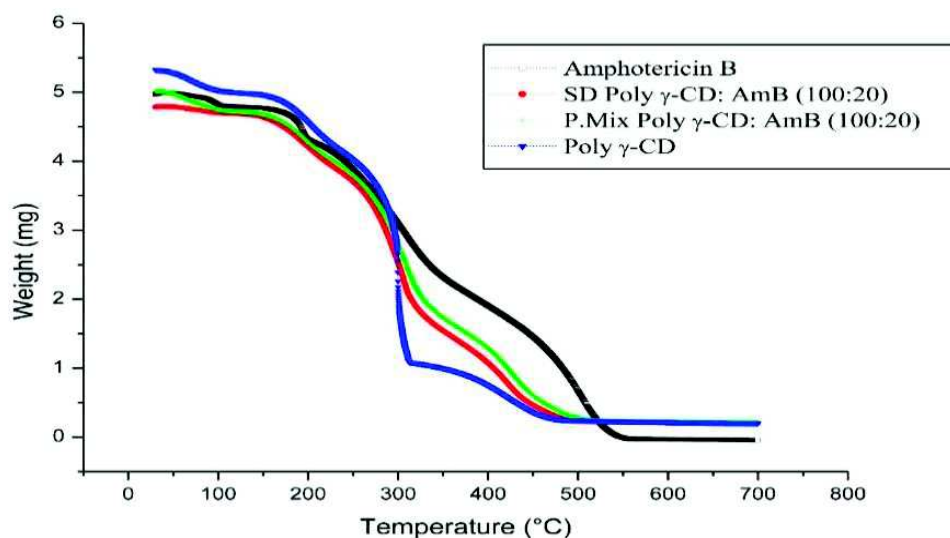


Figure 4. Thermal analysis of amphotericin B (AmB), uncharged solid dispersion of γ -cyclodextrin based polymer (Poly γ -CD), physical mixture of γ -cyclodextrin based polymer with AmB and solid dispersion based Poly γ -CD and AmB (SD Poly γ -CD/AmB).

3.2.5. Infrared and Raman Spectroscopy Property

The spectra of active ingredient showed the presence of a characteristic peak (Table 3) [27]. A broad absorption band connected to a strong bond corresponding to a ν_{OH} stretching vibration that explains the presence of intermolecular hydrogen bonds between molecules of polyene [24].

Table 3. Characteristic bands of amphotericin B in infrared spectroscopy.

Compound	Absorption (cm^{-1})	Nature of Bond	Type of Vibration
Amphotericin B	1557.8 cm^{-1}	$\delta_{\text{s}}\text{N-H}$ (in the plan)	Deformation
	1590 cm^{-1}	$\nu_{\text{C-C}}$	Stretching
	1690.17 cm^{-1}	$\nu_{\text{as}}\text{C=O}$ [COOH]	Stretching
	2934.5 cm^{-1}	$\nu_{\text{s+as}}$ [CH ₂ , CH ₃]	Stretching
	3360.6 cm^{-1}	$\nu_{[\text{CH}]}$ polyene	Stretching

The interactions between γ -CD and AmB were studied by infrared spectroscopy. The elongation of the absorption band at 1020 cm^{-1} characteristic to the β -glycosidic linkage and the disappearance of the absorption bands at 1396 cm^{-1} could translate the interaction of AmB with the hydrophobic cavity of γ -CD via a C–H bond. An increase in intensity and a slight shift of the absorption band between 3000 and 3500 cm^{-1} was observed and that could be explained by the host–guest interactions as a consequence of water release upon inclusion. The disappearance of characteristic bands of AmB (N–H, and C=O) means the formation of single compound from AmB and γ -cyclodextrin as a result of AmB inclusion in γ -CD characterized by a sufficient cavity size (approximately 8.5 Å) for receiving an antifungal molecule (Figure 5).

About cyclodextrin polymers used, we noted a broad absorption band at 3330 cm^{-1} that corresponds to the stretching vibration ν_{OH} and explains a high polymer molecular association through intermolecular bonds between dimer entities. According to Skiba et al. [18], this interaction is due to condensation reaction between C=O carboxylic of citric acid and hydroxyl group (–OH) from the oligosaccharide entity (natural CD). The spectral analysis and comparison between solid dispersion-based homopolymer CDs and physical mixture (Figure 5) were illustrated by the higher frequency shift of the unsaturated acid carbonyl C=O stretching band from 1690 cm^{-1} at 1719 cm^{-1} in the spray-dried formulations, when it was maintained in the physical mixture. This change was caused by decreasing the crystallinity of AmB molecules present in the polymer matrix [25].

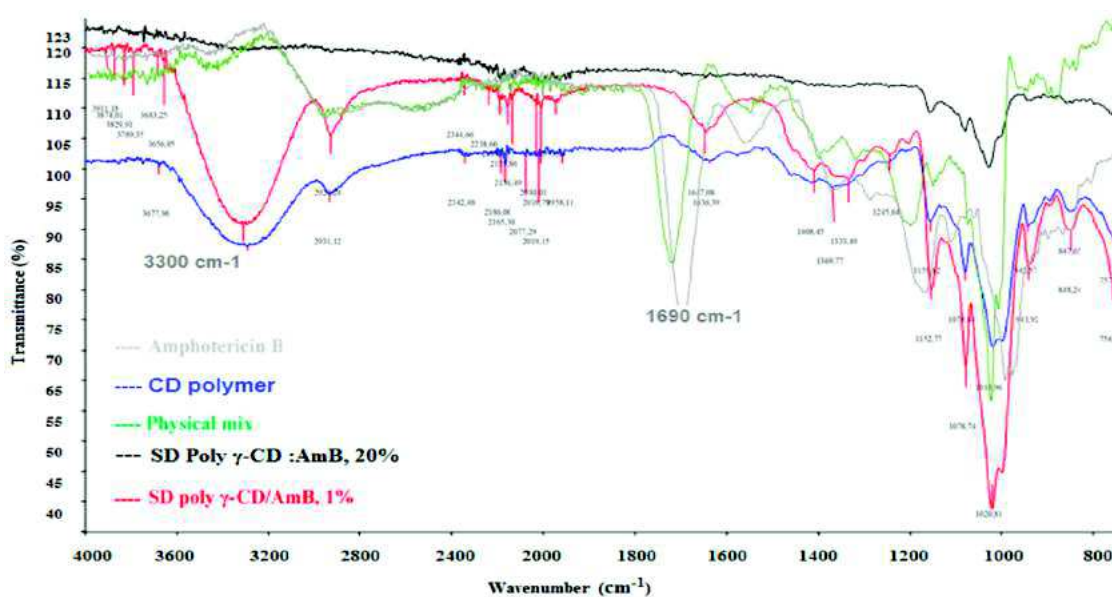


Figure 5. FTIR spectra of amphotericin B, uncharged solid dispersion of γ -cyclodextrin polymer (poly γ -CD), physical mixture and amorphous solid dispersion based γ -cyclodextrin polymer and AmB (SD poly γ -CD/AmB).

The spectral translation of the solid dispersion-based Poly γ -CD was essentially manifested by a great reduction or disappearance of the band at 3360.5 cm^{-1} corresponding to the OH stretching vibration and strong hydrogen bonds [OH ... HO], that can be explained by the dissociation of intermolecular hydrogen bonds between the molecules of the AmB, and suggesting a monomeric AmB dispersion in the matrix. This phenomenon was absent in the inclusion complex with γ -CD. Another band was disappeared at 2930 cm^{-1} (CH_{alkyl}) in the SD when this loss was not remarked in the IC containing Is the space necessary? CD suggesting a difference of AmB interaction between the γ -CD and the poly γ -CD.

The Raman spectroscopy analysis of pure AmB presents three bands at 1001.8 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} and 1559 cm^{-1} , corresponding to C–C–H, C=O and C=C, respectively (Figure 5) [9,10]. Principally, the comparison between the Raman spectra of amphotericin B, physical mixture (PM) and solid dispersion (SD) were distinguished by a modification at spectral regions concerning polyenic vibrations (Figure 5). A first major change was reflected by an increase in the peak intensity characteristic to AmB C–CH bonds in the SD and IC that could be explained by the inclusion of AmB in the solid matrix [28]. This interaction was not observed in the physical mixture. The shift to lower frequency by a wavenumber of 3 cm^{-1} of the principal band from 1559 cm^{-1} to 1556 cm^{-1} was resulted to the delocalization of π electron system caused by the broadening from the 1535 to 1556 cm^{-1} , indicating an AmB crystallinity decrease. The transformation was approved by the strong decrease of the band at 1008 cm^{-1} of infrared spectroscopy (Figure 5).

Those changes reflect the amorphous transformation of AmB molecules in the polymeric dispersion [29]. The differentiation between the inclusion complex, the solid dispersion based on γ -CD entities and γ -CDs homopolymer was mainly expressed by the band widening between 1535 cm^{-1} to 1556 cm^{-1} in the solid dispersion meaning a transformation of crystalline AmB to amorphous state while it did not appear in the inclusion complex spectra analysis (Figure 6). Another important shift to a lower frequency from 1559 cm^{-1} to 1556 cm^{-1} in both formulas means that AmB was not included only in the cavities of the γ -CD but also dispersed in polymeric networks [30].

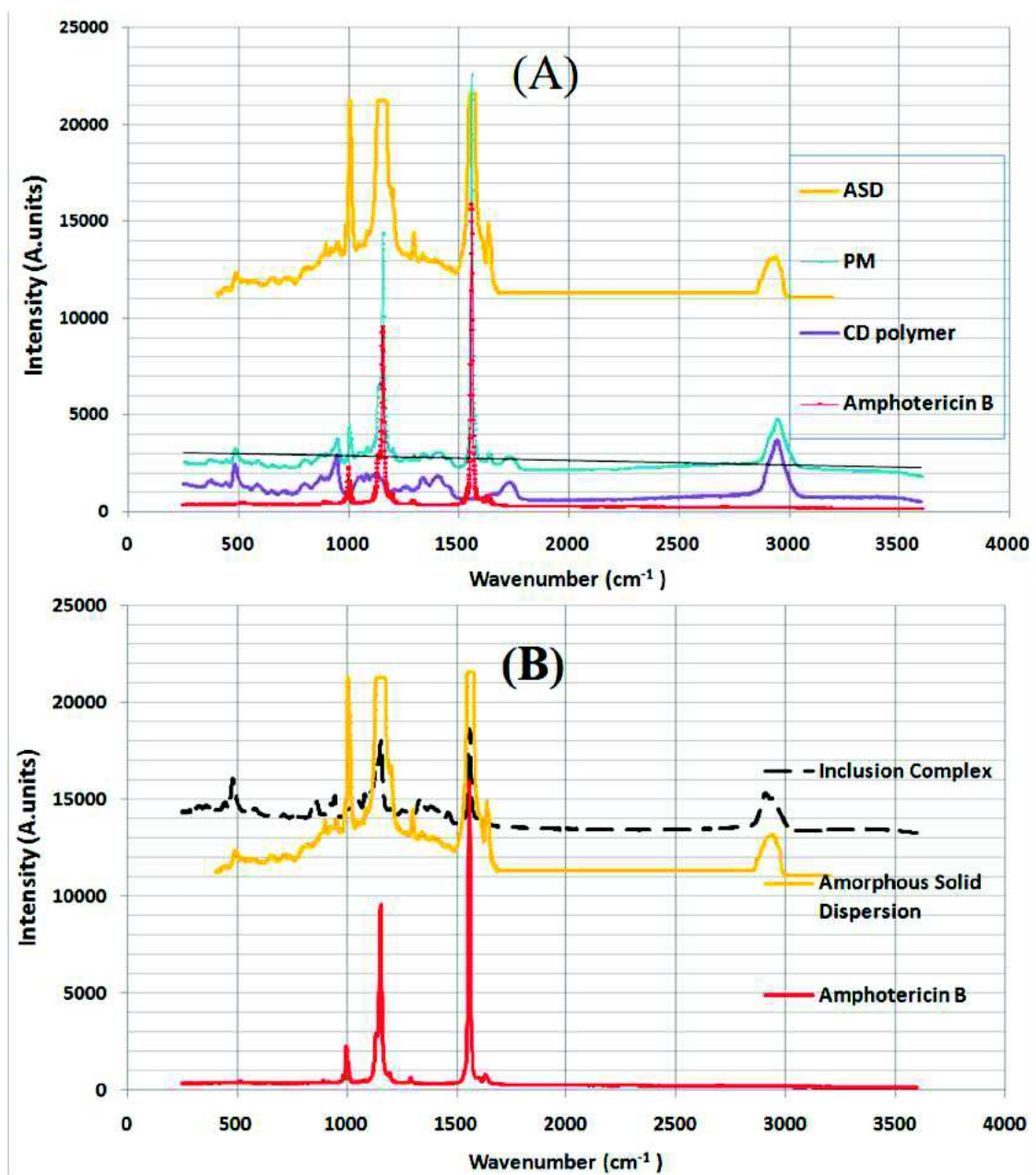


Figure 6. (A) Raman spectra of amphotericin B, cyclodextrin polymer (Poly- γ -CD), physical mixture (PM) and amorphous solid dispersion (ASD). (B) Raman spectra of amphotericin B, ASD and inclusion complex.

3.2.6. Aggregation Studies by UV

The state of AmB molecule aggregation within the solid dispersion was studied in order to obtain more information on the aggregation state present in the developed formulation for a possible prediction of their efficacy and toxicity [15]. The spectrophotometry of AmB absorbance may reveal both the AmB molecular form present in the aqueous medium and the conformational state of such molecules. Those conformations are responsible of efficacy and toxicity. In addition, the influence of other constituents on different AmB aggregation states has been studied to find the more stable form [31]. Free amphotericin B cannot be completely dissolved in water during our aggregation studies. Methanol was used to obtain a solvent (MetOH:water 1:1) able to dissolve the free form of this drug.

This solvent was the same for all studied formulations and, therefore, induced the same potential alteration of drug interaction with polymer.

The UV spectrum of AmB in MeOH/H₂O mixture at approximately 10 µg/mL was principally represented by the presence of four bands, one at 347 nm followed by three well-separated bands at 364 nm, 384 nm and 408 nm (Figure 7). The last one was considered as the principal absorption confirming the great presence of AmB monomer form and different aggregate forms [32,33]. In the literature, the spectrum of Fungizone[®] showed an intense broad peak at 329 nm and a lower absorption for the other peaks resulting in the self-aggregation of AmB [16]. The increase of AmB concentration was revealed by the improvement of the first band at 347 nm and the apparition of another band at 421 nm suggesting the high aggregation of AmB in aqueous solution [32].

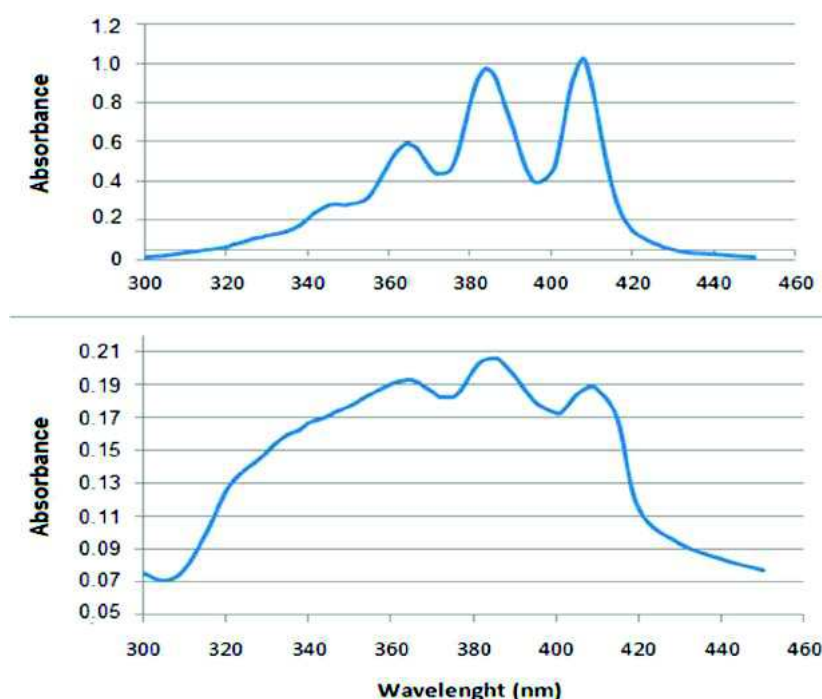


Figure 7. Spectra of electronic absorbance of AmB in MeOH:H₂O (1:1) at 10 µg/mL (**top**) and solid dispersions of γ -cyclodextrin polymers and amphotericin B (100:20) at 10 µg/mL in deionized water (**bottom**).

The UV spectrum of AmB in MeOH/H₂O mixture at approximately 10 µg/mL was principally represented by the presence of four bands, one at 347 nm, followed by three well-separated bands at 364 nm, 384 nm and 408 nm (Figure 7).

The analysis of the obtained spectrum can be used to determine a ratio between Peak I and peak IV considered as an index of relative aggregation state. The index of AmB and Fungizone[®] was equal at 0.28 and 3.7, respectively.

The electronic absorbance of amorphous Poly γ -CD solid dispersion was illustrated by the presence of the three bands at 365 nm, 384 nm and 408 nm showing the great presence of monomeric AmB [4]. The lack of those bands (329 nm and 421 nm) can indicate that the AmB has a good monomeric distribution within the polymeric network, was generally in monomer form and may present also in the dimeric form so the most preferred aggregation state in terms of drug action and toxicity [16,32]. In aqueous medium, the dimerization by the association of AmB monomers was quickly established before the aggregation in water. The dimers in their different assemblage (parallel and anti-parallel) were stabilized by Van der Waals interactions also hydrophobic interactions responsible for aggregation [33–35]. The dimerization and aggregation phenomena were prevented by Poly γ -CD and the AmB monomers present in the mixture. The distribution of AmB in aqueous

solutions at over a critical concentration (at $C > 10^{-7}$ M) was distinguished by the presence of three different shape balances. These forms were dependent to the AmB concentration, the medium of solubilization and the action of the solid matrix. The highest toxicity was caused by the aggregates, less toxicity was obtained by the oligomer, essentially a dimeric form while the best antifungal active form was the AmB monomer that reduces the renal toxicity [32], demonstrating the utility to design AmB in solid dispersion with Poly γ -CD as matrix.

3.3. In Vitro Dissolution Study

The dissolution study compared to drug in free form is one of the crucial tests to obtain information about predicted in vivo behavior of designed formulations and their contained drug. The dissolution studies of AmB alone, and AmB included in solid dispersion at simulated gastric fluid (pH = 1.2) was remarked by the diminution of present quantity in the medium due to the degradation caused by the acid catalysis [36]. While the dissolution of AmB from the SD at pH = 7.4 was completely done after 45 min, it was not valid for the pure drug where only 60% was entirely dissolved (Figure 8).

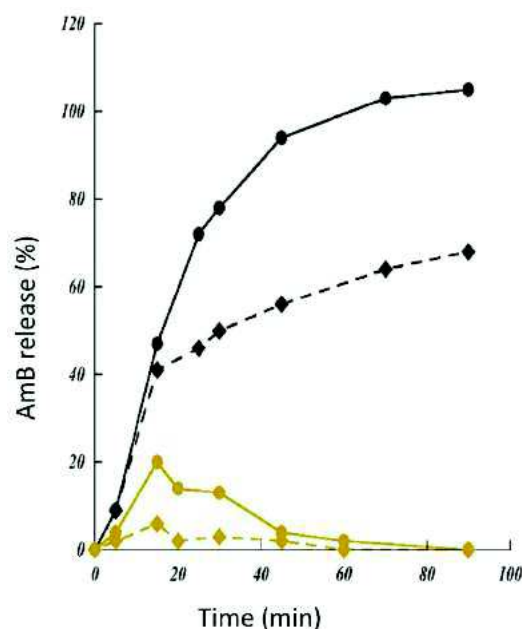
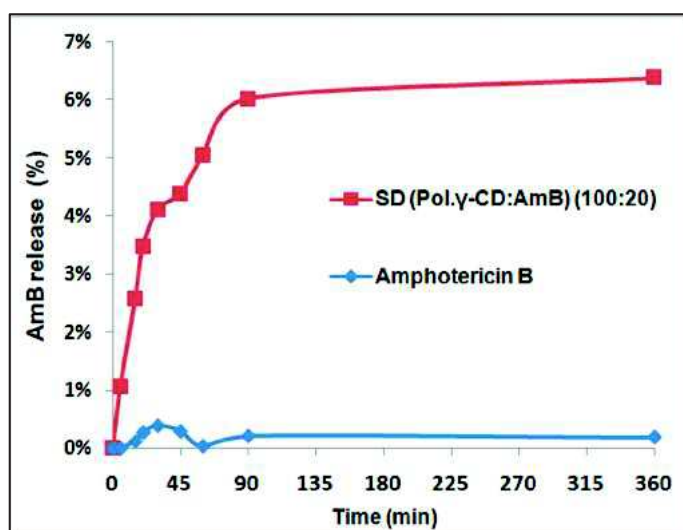


Figure 8. In vitro release profiles of amphotericin B (AmB) in gastric (gold, pH = 1.2) or pulmonary media (black, pH = 7.4). Drug was in free form (lozenges) or contained in solid dispersions based γ -cyclodextrin polymers (filled circles).

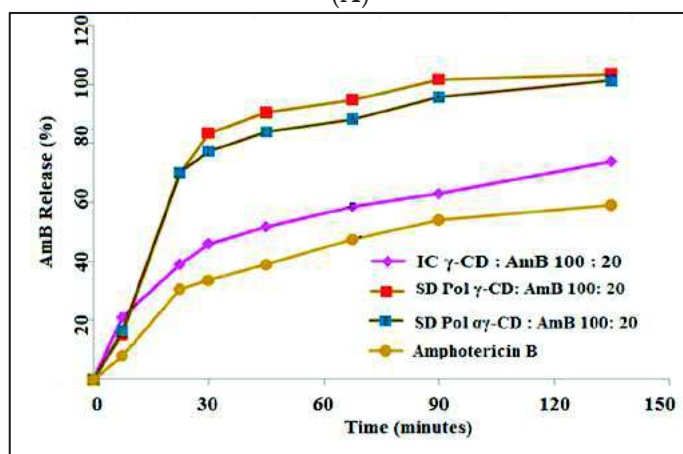
At a low surfactant concentration (0.02% w/v), the dissolution profile of the SD at high AmB loading (approximately 15%) was rapid and 30-times greater than the AmB alone after 120 min. At a higher surfactant concentration (0.1% w/v), a rapid release profile was obtained for SD-based homopolymer-CD dispersions with complete dissolution at 40 min while at the same moment, only 40% of AmB in free form was dissolved (Figure 9). Increasing the amount of methanol in the initial composition of the formulations induced larger particles, leading to both a reduce wettability and delayed dissolution profiles.

The comparison of the dissolution curves of γ -CD and Poly γ -CD entities gives crucial information about the AmB distribution in these two different matrices. A complete release achieved within 40 min was observed for the solid dispersions that proves the presence of monomeric dispersion of the AmB. This was the consequence of more interactions between AmB and Poly γ -CD, probably due to H-binding with acid functions of citric acid. With γ -CD, only drug interactions with the hydrophobic cavities of cyclodextrins could be performed, limiting the number of host molecules in this matrix. Hence, the presence of an excess of AmB in an aqueous medium gives rise to the dimerization of the

polyenes between them through intermolecular interactions, preventing dissolution. This explains why only 65% of the AmB were dissolved even after 2 h with inclusion complexes formulation.



(A)



(B)

Figure 9. Dissolution profiles of AmB, solid dispersions (SD) with different polymers composition ($\alpha\gamma$ -poly CD, γ -poly CD) and inclusion complex (IC) in simulated fluid medium pH = 7.4 with 0.02% (A) or 0.1% SLS (B).

For the same AmB amount loading (approximately 15%), the difference between the IC (γ -CD: AmB) and ASD (based Poly γ - or Poly $\alpha\gamma$ -CD) was clearly observed (Figure 10). At 20 min, only half of the present AmB quantity was dissolved from the IC compared to the ASD. Additionally, the AmB from the different ASD was completely dissolved after 45 min. This is due to the good exposition of AmB particles to the dissolution medium because of the difference in drug loading and the fact that the CD polymers allow a good wettability of AmB particles which are well dispersed in the system. So, the polymeric structure offers to the antifungal drug the possibility of state change and decreasing crystallinity, preventing the polyenic molecular association and permitting a good dissolution due to good exposition particle size reduction. These results could be explained by a better dispersion of AmB monomers in the polymeric structure.

The physical mixture demonstrated a slight interaction between AmB and CD polymers by DSC that was confirmed by the significance of spray-drying process in the dissolution compartment in terms of the elimination of residual humidity and amorphous change state (Figure 10). The importance of

the atomization at high pressure and temperature was confirmed by the rapid dissolution spray-dried AmB (56% reached at 15 min compared to 30% for AmB bulk).

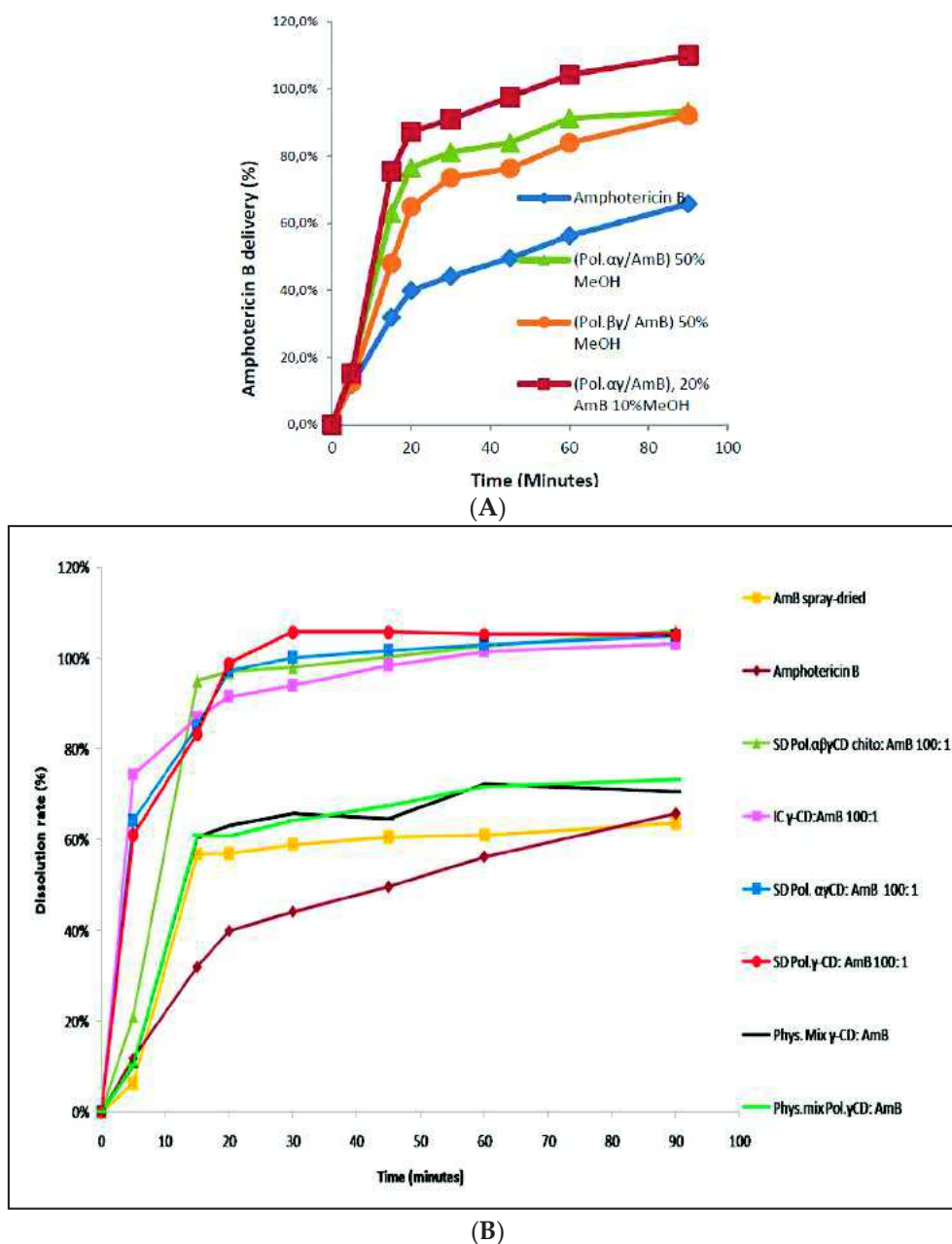


Figure 10. Dissolution profiles of cyclodextrin terpolymers ($\beta\gamma$ -CD, $\alpha\gamma$ -CD) for different methods of preparation (A). Comparison of dissolution profiles between the different spray-dried formulations solid dispersions (SD), AmB: bulk and spray-dried, physical mixture (Phys. Mix) (B).

The dissolution behavior of solid dispersions was impacted by the choice of polymer compound and its composition in natural cyclodextrin, the ratio of AmB in the powder and spray-drying processing conditions. Even the slight difference in terms of solubility between γ -CD and the polymer of γ -CD, the advantages of polymeric structure were observed in dissolution studies, and AmB onomeric structure within polymers in the solid state. The fundamental properties of CD polymers were expressed in a different behavior in the solid state. An amorphous state is obtained by the spray-drying technique where during atomization, the H_2O molecules were discarded and AmB molecules were placed in the dense polymeric network. The result was confirmed by the inability

to charge the γ -CD in the solid state even after atomization. In spite of the strongest Van der Waals interactions in the solid state because the shortness of distance, γ -CD polymers have a capacity of offering a good AmB distribution to decrease the aggregation phenomena.

4. Conclusions

The concept of spherical amorphous solid dispersions 4.0 brings an interesting formulation alternative with the use of innovative Poly-CD. Indeed, this allows us to develop powders having high AmB monomers loading (15% (w/w)) in comparison to inclusion complex with natural cyclodextrin. The solid particles were advantageous for the improvement of the dissolution profile (100% at 40 min at pH = 7.4) through the solubility increase, as well as the reduction of the particle size allowing good wettability of particles in dissolution. Also, the controlled release can be obtained by this 4th generation of solid dispersions [17]. Furthermore, the synthesis process of different polymers of cyclodextrins as described by Skiba et al. [18] is simple, rapid and without organic solvent, and their biodegradable composition may offer a human use possibility. The physicochemical properties and the behavior of AmB in the polymeric matrix were demonstrated by spectroscopy. The infrared spectroscopy gives us an idea about the interaction between the polyene and oligosaccharide of cyclodextrin. The inclusion of AmB within the cavities was also confirmed. This was confirmed by both, (i) the low water quantities present in the spray-dried formulations as a consequence of water molecules substitution in the inner cavity of CD, and (ii) the decrease with Poly-CD of AmB crystallinity observed by DSC, Raman and infrared spectroscopy. The amphotericin B amorphization was probably a consequence of its interaction with Poly- γ -CD by dipole–dipole interactions and without a creation of covalent binding with the host molecule because the drug release was facilitated by the binary matrix. The spray-dried amphotericin B amorphous solid dispersions 4.0 technology showed, in consequence, the possibility of drug development for oral utilization or as powder aerosols for pulmonary administration.

Author Contributions: Conceptualization, M.S. and M.L.-S.; Methodology, F.H., L.M.; Software, G.D.; Validation, L.M., F.H. and M.L.-S.; Formal Analysis, M.L.-S., F.H. and M.S.; Investigation, L.M. and F.H.; Resources, M.L.-S.; Data Curation, L.M., G.L.; Writing—Original Draft Preparation, L.M., F.H. and M.L.-S.; Writing—Review & Editing, M.S. and F.H.; Visualization, M.L.-S. and F.H.; Supervision, M.L.-S., F.H. and M.S.; Project Administration, M.L.-S., M.S. and F.H.; Funding Acquisition, M.S. and M.L.-S.

Funding: This research was funded by Wanylab—Algeria and “The APC was funded by Dr. Mohamed SKIBA.

Acknowledgments: The authors are grateful to In-cyclo [startup—France] for providing gift samples of cyclodextrin polymers.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hartsel, S.; Bolard, J. Amphotericin B: New life for an old drug. *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 445–449. [[CrossRef](#)]
2. Reichenberger, F.; Habicht, J.M.; Gratwohl, A.; Tamm, M. Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Eur. Respir. J.* **2001**, *19*, 743–755. [[CrossRef](#)]
3. Wu, C.-Y.; Benet, L.Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 11–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Torrado, J.J.; Espada, R.; Ballesteros, M.P.; Torrado-Santiago, S. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2405–2425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zu, Y.; Sun, W.; Zhao, X.; Wang, W.; Li, Y.; Ge, Y.; Liu, Y.; Wang, K. Preparation and characterization of amorphous amphotericin B nanoparticles for oral administration through liquid antisolvent precipitation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *53*, 109–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Prajapati, V.K.; Awasthi, K.; Yadav, T.P.; Rai, M.; Srivastava, O.N.; Sundar, S. An Oral Formulation of Amphotericin B Attached to Functionalized Carbon Nanotubes Is an Effective Treatment for Experimental Visceral Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **2012**, *205*, 333–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Singh, K.; Tiwary, A.K.; Rana, V. Spray dried chitosan-EDTA superior microparticles as solid substrate for the oral delivery of amphotericin B. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *58*, 310–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Yang, Z.; Chen, M.; Yang, M.; Chen, J.; Fang, W.; Xu, P. Evaluating the potential of cubosomal nanoparticles for oral delivery of amphotericin B in treating fungal infection. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 327–336.
9. Wasan, E.K.; Bartlett, K.; Gershkovich, P.; Sivak, O.; Banno, B.; Wong, Z.; Gagnon, J.; Gates, B.; Leon, C.G.; Wasan, K.M. Development and characterization of oral lipid-based amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. *Int. J. Pharm.* **2009**, *372*, 76–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Jain, S.; Valvi, P.U.; Swarnakar, N.K.; Thanki, K. Gelatin Coated Hybrid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery of Amphotericin B. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2542–2553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Italia, J.L.; Kumar, M.N.V.R.; Carter, K.C. Evaluating the Potential of Polyester Nanoparticles for Per Oral Delivery of Amphotericin B in Treating Visceral Leishmaniasis. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2012**, *8*, 695–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhang, C.; Gu, C.; Peng, F.; Liu, W.; Wan, J.; Xu, H.; Lam, C.W.; Yang, X. Preparation and Optimization of Triptolide-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery with Reduced Gastric Irritation. *Molecules* **2013**, *18*, 13340–13356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Skiba-Lahiani, M.; Hallouard, F.; Mehenni, L.; Fessi, H.; Skiba, M. Development and characterization of oral liposomes of vegetal ceramide based amphotericin B having enhanced dry solubility and solubility. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2015**, *48*, 145–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Clemons, K.V.; Stevens, D.A. Comparative Efficacies of Four Amphotericin B Formulations—Fungizone, Amphotec [Amphocil], AmBisome, and Abelcet—Against Systemic Murine Aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1047–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Espada, R.; Valdespina, S.; Alfonso, C.; Rivas, G.; Ballesteros, M.P.; Torrado, J.J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int. J. Pharm.* **2008**, *361*, 64–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tiyaboonchai, W.; Limpeanchob, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329*, 142–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hallouard, F.; Mehenni, L.; Lahiani-Skiba, M.; Anouar, Y.; Skiba, M. Solid Dispersions for Oral Administration: An Overview of the Methods for their Preparation. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 4942–4958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Skiba, M.; Lahiani-Skiba, M. Novel method for preparation of cyclodextrin polymers: Physico-chemical characterization and cytotoxicity. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, *75*, 341–349. [[CrossRef](#)]
19. Mathpal, D.; Garg, T.; Rath, G.; Goyal, A.K. Development and characterization of spray dried microparticles for pulmonary delivery of antifungal drug. *Curr. Drug Deliv.* **2015**, *12*, 464–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Higuchi, T.; Connors, K.A. A phase solubility technique. *Adv. Anal. Chem. Inst.* **1965**, *4*, 117–211.
21. Boukhris, T.; Lahiani-Skiba, M.; Martin, D.; Skiba, M. Novel oral Formulation of cyclosporine-spray-dried dispersion using cyclodextrin terpolymers. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, *75*, 323–332. [[CrossRef](#)]
22. Marques, M.R.C.; Loebenberg, R.; Almukainzi, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technol.* **2011**, *18*, 15–28. [[CrossRef](#)]
23. International Conference of Harmonisation [ICH]. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005. Available online: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (accessed on 12 May 2018).
24. Gagoś, M.; Arczewska, M. Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, *11*, 2124–2130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Al-Assady, N.A.; Ali, E.S.; Alrubayae, I.M. Preparation, Characterization and Evaluation of Controlled Release Microspheres Containing Amphotericin B. *J. Basrah Res.* **2013**, *39*, 114–131.
26. Fatmi, S.; Bournine, L.; Iguer-Ouada, M.; Lahiani-Skiba, M.; Bouchal, F.; Skiba, M. Amorphous solid dispersion studies of camptothecin-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000. *Acta Pol. Pharm.* **2015**, *72*, 179–192. [[PubMed](#)]
27. Butani, D.; Yewale, C.; Misra, A. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *139*, 17–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bunow, M.R.; Levin, I.W. Vibrational raman spectra of lipid systems containing amphotericin B. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1977**, *464*, 202–216. [[CrossRef](#)]

29. Gagoś, M.; Kamiński, D.; Arczewska, M.; Krajnik, B.; Maćkowski, S. Spectroscopic evidence for self-organization of N-iodoacetylamphotericin B in crystalline and amorphous phases. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12706–12713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Chen, Y.; Wang, S.; Wang, S.; Liu, C.; Su, C.; Hageman, M.; Hussain, M.; Haskell, R.; Stefanski, K.; Qian, F. Initial Drug Dissolution from Amorphous Solid Dispersions Controlled by Polymer Dissolution and Drug-Polymer Interaction. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 2445–2458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Gangadhar, K.N.; Adhikari, K.; Srichana, T. Synthesis and evaluation of sodium deoxycholate sulfate as a lipid drug carrier to enhance the solubility, stability and safety of an amphotericin B inhalation formulation. *Int. J. Pharm.* **2014**, *471*, 430–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Barwicz, J.; Christian, S.; Gruda, I. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2310–2315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mazerski, J.; Bolard, J.; Borowski, E. Effect of the modifications of ionizable groups of amphotericin B on its ability to form complexes with sterols in hydroalcoholic media. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **1995**, *1236*, 170–176. [[CrossRef](#)]
34. Mazerski, J.; Grzybowska, J.; Borowski, E. Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. *Eur. Biophys. J. EBJ* **1990**, *18*, 159–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zielińska, J.; Wiczór, M.; Bączek, T.; Gruszecki, M.; Czub, J. Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rajagopalan, N.; Chen, S.C.; Chow, W.-S. A study of the inclusion complex of amphotericin-B with γ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* **1986**, *29*, 161–168. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Chapitre 4

Développement et caractérisation physico-chimique de dispersions solides amorphes sphériques formulées à base de polymères de cyclodextrines cationiques et d'Amphotéricine B pour des applications potentielles par voie pulmonaire.

Resumé

L'objectif de ce travail est axé sur le développement de dispersions solides amorphes sphériques innovantes à base de polymères de cyclodextrines cationiques par couplage à des molécules de chitosan. La préparation de telles dispersions solides par la méthode de séchage par atomisation ou spray-drying conduit à l'obtention de fines particules sphériques adaptées à une inhalation sous forme d'aérosol sec pour un effet au niveau pulmonaire. Nous avons étudié l'intérêt de ce nouvel outil galénique pour améliorer l'index thérapeutique de l'Amphotéricine B en vue du traitement de l'aspergillose pulmonaire invasive. La solubilité intrinsèque de l'AmB a été améliorée d'un facteur 1800 par complexation avec des polymères de cyclodextrines cationiques (poly γ -CD chitosan) et d'un facteur 760 avec des polymères de cyclodextrines non chargés (poly γ -CD). L'analyse par RMN ^1H a confirmé une incorporation élevée d'AmB au sein des matrices polymériques constituées aussi bien de γ -CD que de γ -CD chitosan.

Le chitosan, très utilisé dans la composition des médicaments destinés à être administrés par inhalation pour la voie pulmonaire, a été incorporé lors de la synthèse des polymères de cyclodextrines du fait de ses propriétés biodégradable et biocompatible. L'étude de la lyodisponibilité *in vitro* des dispersions solides, sous forme de poudres sèches chargées en AmB, a été réalisée dans un milieu de dissolution mimant la composition du fluide pulmonaire. Les résultats obtenus démontrent une bonne performance de la dissolution qui atteint un taux de près de 78% comparativement à la poudre d'AmB pur dont le taux ne dépasse pas 3%. Les études *in vitro* des propriétés aérodynamiques des poudres sèches à l'aide d'un impacteur à cascades NGI[®] ont montré des résultats satisfaisants avec un dépôt des particules solides dans les niveaux inférieurs à des quantités élevées au stade C4 où les particules solides ont présenté un MMAD = 2,48 μm , une FPF = 29,5% et un RF = 39,5%.

La voie pulmonaire pourrait constituer une alternative à la voie injectable et permettre d'augmenter le potentiel thérapeutique de l'antifongique AmB. L'administration de plus faibles doses, pouvant atteindre plus facilement les lésions pulmonaires tout en évitant des

effets secondaires importants comme une toxicité rénale, serait une avancée majeure pour le traitement de l'aspergillose pulmonaire invasive.

Development and physicochemical characterization of spherical amorphous solid dispersions based on cationic cyclodextrin polymers and Amphotericin B for potential pulmonary applications

L. Mehenni ^{1,2}, M. Lahiani-Skiba², J.C. Debouzy³, J.C. Olivier ⁴, M. Skiba²

[1] Normandie University, University of Rouen, Technology Pharmaceutical and Biopharmaceutical Laboratory, DC2N, INSERM U1239, UFR Medicine and Pharmacy, 22 Blvd. Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France

[2] Normandie University, University of Rouen, UMR 6014 COBRA, IRCOF, Rue Tesnière, 76821 Mont Saint Aignan, France

[3] Institut de Recherches Biomédicales du Service de Santé des Armées, 91223 Bretigny, France

[4] University of Poitiers, Faculty of Medicine and Pharmacy, 6 rue de la Milétrie, TSA 51115, 86073 Poitiers Cedex 9, France

*Correspondent: M. Skiba.

E-mail: mohamed.skiba@univ-rouen.fr

ABSTRACT

The aim of this work was the development of spherical amorphous solid dispersions of amphotericin B based on cationic cyclodextrin polymers by coupling to chitosan molecules. The solid dispersions prepared by spray-drying lead to the obtaining of fine spherical particles suitable for inhalation in the form of dry aerosol. We have studied the interest of this new galenic tool to improve the therapeutic index of amphotericin B against invasive pulmonary aspergillosis. Compared to intrinsic solubility, the hydrosolubility of AmB was enhanced by a factor 1800, and 760 in an aqueous solution of poly γ -CD chitosan and poly γ -CD respectively. The ¹H-NMR analysis have confirmed a high incorporation of AmB within the homopolymers of cyclodextrins (γ and γ -chitosan)

The chitosan which has good properties for the drugs used by inhalation was preferred in the CDs polymers synthesis because it was favourable. The *in vitro* dissolution of amphotericin B loaded spray-dried particles in modified simulated lung-fluid (m-SLF) demonstrated a good dissolution performance which attains approximately 78% compared to 3% for AmB alone. The *in vitro* studies of aerosol performance showed acceptable aerodynamic properties with a deposition of solid particles on every stage with high quantities at the stage C₄, where the solid particles presented a MMAD= 2.48 μ m, a fine particle fraction (FPF= 29.5%) and a retention fraction (RF= 39.5%). The pulmonary route could be an alternative to the parenteral route to increase the therapeutic potent of this antifungal drug and to delivery lower doses

Discussion Générale

Un premier travail a consisté à développer des liposomes d'AmB incluant dans leur composition des céramides végétales pour une application potentielle pour la voie orale.

L'utilisation des liposomes en tant qu'outil galénique a été d'un apport considérable depuis plus d'une vingtaine d'années dans le traitement des maladies fongiques (167,168). En effet, ces vecteurs offrent plusieurs avantages en termes d'encapsulation des molécules aussi bien hydrosolubles que liposolubles, de ciblage passif cellulaire, de libération prolongée pour une action locale ou systémique et aussi d'amélioration de la capacité de pénétration à travers les membranes biologiques(169). Comme alternative à la voie parentérale, nous avons étudié le développement de liposomes destinés à la voie orale pour l'administration de l'AmB principalement pour diminuer le caractère néphrotoxique de cet antifongique par voie systémique.

Les céramides, une combinaison de sphingosine et d'acide gras, sont l'un des constituants des membranes cytoplasmiques cellulaires qui semble jouer un rôle prépondérant dans la construction de la bicouche phospholipidique et pour maintenir l'organisation de la barrière lipidique membranaire. De part leurs caractéristiques structurelles, les céramides végétales associées à d'autres phospholipides dans une formulation de liposomes, pourraient conférer une certaine rigidité à la paroi liposomale et permettre ainsi une meilleure résistance vis-à-vis de l'activité des sels biliaires et des enzymes digestives après administration par voie orale (170).

Nous avons préparé différentes formulations de liposomes pour l'encapsulation de l'AmB, à base de céramides végétales couplées ou non à des phospholipides. Les résultats obtenus ont montré qu'une composition à base de céramides végétales (CER), de cholestérol (CHO) encapsulant de l'AmB a permis d'obtenir des vésicules d'un diamètre moyen compris entre 100 et 300nm. Par contre, la présence d'autres phospholipides semble indispensable à la formation d'un système lamellaire avec des bicouches externes. Ainsi, l'ajout de phospholipides de type L- α -phosphatidylcholine de jaune d'oeuf (EPC) a permis d'obtenir des liposomes multilamellaires d'une taille particulière entre 300 et 500 nm et avec un rendement d'encapsulation de l'AmB de l'ordre de 75%. De même, l'apport de phospholipides de type L- α -phosphatidylcholine-distearoyl (DSPC) dans la formulation de nos liposomes a conduit à l'obtention d'un même taux d'encapsulation élevé (75%). Par ailleurs, l'absence de cholestérol dans ces formulations ramène le taux d'encapsulation à la valeur plus faible de 45%, ce qui conforte que ce constituant, bien connu pour jouer un rôle prépondérant dans

l'ordre conformationnel des chaînes lipidiques et pour stabiliser les membranes des liposomes en apportant une certaine rigidité, puisse aussi contrôler la libération de la molécule active encapsulée en limitant sa fuite rapide (171,172).

L'apport des céramides naturelles n'a pas eu effet sur le diamètre moyen de la structure liposomale, vraisemblablement du fait que celles-ci prennent la place de l'AmB au sein des liposomes, contrairement aux structures sans céramides où l'inclusion de l'AmB au sein des feuilletts bimoléculaires des phospholipides a comme conséquence un doublement de diamètre de la matrice liposomale. Nous suggérons deux modes de distribution de l'AmB dans les structures (CER : CHO : EPC) : le premier serait la présence de l'AmB libre en solution, et la seconde serait son adsorption au niveau de la surface externe des liposomes, limitant ainsi un phénomène de compétition entre l'AmB encapsulée et les céramides.

La conception des liposomes à base de céramides végétales a pour but d'accroître l'efficacité de l'AmB et de limiter sa toxicité lors d'une administration par voie orale. La stabilité des liposomes au sein du tractus gastro-intestinal est donc un prérequis indispensable pour cette voie d'administration retenue.

Les différentes formulations que nous avons développées ont été étudiées dans un modèle artificiel « Estomac-duodénum » mimant les conditions physiologiques afin d'étudier leur aptitude à résister à l'action des enzymes digestifs et à l'effet détergent des sels biliaires dans le but d'évaluer ainsi leur stabilité lors d'une administration *per os*. Dès 30 minutes d'incubation dans le milieu gastro-intestinal artificiel, nous avons noté une augmentation du diamètre moyen des vésicules mais l'incorporation de céramides végétales dans la composition des liposomes (CER : CHO : EPC) semble limiter ces variations de manière comparative aux formulations sans céramides. L'apport de céramides semble aussi limiter la libération rapide de l'AmB encapsulée car nous avons montré que pour libérer 50% de la quantité d'AmB piégée au sein des liposomes, il faudrait trois fois plus de temps pour la structure (EPC : CHO : CER) que pour la structure (EPC : CHO).

La comparaison entre les liposomes contenant des céramides végétales et différents types de phospholipides ont donné des résultats intéressants en termes d'intégrité de structure dans le milieu gastro-intestinal. En effet, la présence de phospholipides DSPC dans la formulation a conduit à une meilleure résistance des liposomes au sein du modèle artificiel, ce qui pourrait s'expliquer par la valeur de la température de transition de phase de ce type de phospholipides

(Tg= 55°C) par comparaison à celle du phospholipide EPC (Tg entre -5 et -15°C), et cela indépendamment de la présence des céramides (173,174).

D'après nos résultats, la formulation à base de CER:CHO:DSPC (4:2:1) serait la plus adaptée à une administration de liposomes *per os* car elle préserve une intégrité structurale de la paroi liposomale dans les conditions drastiques du transit digestif tout en limitant la libération rapide au cours du temps de la molécule active encapsulée. Les formulations liposomales d'AmB ont déjà prouvé leur intérêt pour réduire la néphrotoxicité comparativement à la spécialité Fungizone® (175) et pour réduire les effets secondaires reliées à la perfusion (176). L'utilisation de ce type de vecteurs pour une administration de l'AmB par voie orale pourrait encore contribuer à l'amélioration de la biodisponibilité de cet agent en vue du traitement des infections fongiques et de la leishmaniose viscérale (17).

En deuxième partie, nous avons préparé des liposomes en faisant varier différents rapports molaires d'un mélange de deux phospholipides : dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) et dimyristoyl-phosphorylglycerol (DMPG) pour l'encapsulation de l'AmB. Ces 2 phospholipides ont été retenus pour cette étude de caractérisation car ce sont les composants lipidiques les plus abondants et les plus spécifiques du surfactant pulmonaire. Ce sont aussi ces deux phospholipides qui entrent dans la composition de la spécialité pharmaceutique Abelcet® commercialisée sous forme de complexes lipidiques.

Ces liposomes ont été étudiés en tant que modèles membranaires par les techniques de caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ¹H et du phosphore ³¹P et par résonance paramagnétique électronique (RPE) afin de mieux appréhender la nature des interactions entre les bicouches phospholipidiques et la molécule active.

Nous avons retenu plus spécifiquement comme modèles membranaires, les liposomes multilamellaires de grande taille (MLV) et les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV). Des travaux antérieurs font déjà référence à l'utilisation des liposomes d'AmB pour une étude membranaire mais en couplant principalement des méthodes de DSC et de microscopie électronique (177).

L'analyse par RMN du ³¹P de la dispersion pure en DMPC (vésicules multilamellaires) montre une anisotropie à déplacement chimique (CSA) de 58 ppm, appropriée à la phase cristalline des bicouches des phospholipides à base de DMPC (178).

L'étude de la dynamique de la membrane phospholipidique montre que les noyaux de P sont situés au niveau de la tête polaire des phospholipides. Le déplacement anisotrope en fonction de la température nous informe quant à l'état de fluidité de la membrane. Pour le DMPC seul et pour la dispersion multilamellaire (DMPC : AmB) (2 :1), nous avons constaté une diminution de la valeur CSA traduisant une augmentation de la fluidité de la membrane entre les températures 293K et 313K avec une transition de phase à 297K. Cette fluidité membranaire plus marquée s'explique par le passage d'un état semi-solide (gel) à un état cristallin liquide.

L'étude des dispersions (DMPC : DMPG : AmB) a été réalisée à différents rapports molaires. Comme pour les systèmes composés uniquement de DMPC, les systèmes (DMPC : DMPG : AmB) dans un rapport (7 :3 :0) montrent une fluidité membranaire remarquable (diminution de CSA de 6ppm) par augmentation de la température. A 0 ppm, aucune résonance isotropique n'est présente et donc aucune dégradation de membrane ou formation de micelles n'est constatée. Par contre, les systèmes chargés en AmB dans un rapport (7 :3 :5) réagissent différemment au changement de température car l'AmB présent provoque une diminution du CSA, peu importe la température, et donc une augmentation de la fluidité de la membrane. Une ligne isotrope est également constatée et présente à haute température en concordance avec une plus grande fluidité membranaire. Les systèmes dans un rapport (1 :1 :0) présentent une structure en bicouche multilamellaire identique à celle des systèmes dans un rapport (7 :3 :0) avec une fluidité plus élevée et plus marquée encore à haute température. Nous avons identifié deux résonances bien résolues, proches de la ligne isotropique, mais de manière générale le spectre RMN ^{31}P est assez indépendant de la température.

Les spectres RMN ^1H enregistrés à partir des liposomes multilamellaires (MLV) sont difficilement interprétables à haute résolution. Les données de relaxation (T_1 , T_2) pourraient être déduites des résonances méthyliques à 0.8 ppm et l'estimation du temps de corrélation global (τ_c) pourrait l'être en utilisant l'équation de Solomon-Bloembergen (179).

Pour des raisons de dimension géométrique, les liposomes de type unilamellaire de faible diamètre (SUV) semblent plus appropriés à une étude du rôle de l'organisation membranaire que les liposomes de type MLV. En effet, Les liposomes SUV composés de DMPC et d'une taille de l'ordre de 20 nm donnent des spectres avec de meilleures résolutions.

Si l'AmB seul en solution aqueuse ne montre aucune résonance du fait de sa forte hydrophobicité, par encapsulation dans des liposomes SUV, des pics sont présents au

niveaux de l'analyse pouvant signifier une forte interaction de la molécule active avec la membrane lipidique qui constitue ainsi un environnement favorable à sa dissolution(180,181). Les résonances détectées pour l'AmB encapsulé dans les liposomes à base de DMPG et en l'absence de DMPC, dans un rapport (2 :0 :1), démontrent sa présence uniquement dans un environnement hydrophobe compte-tenu qu'il n'est ni soluble et ni détectable dans la partie hydrophile. Ces résonances sont proches de celles obtenues pour les systèmes à base de DMPC seul. Nous avons estimé un taux d'environ 40% d'AmB présent au sein des liposomes mais aussi une modification structurelle des liposomes SUV, suggérant la présence d'AmB à l'intérieur des vésicules mais aussi au sein des membranes liposomales. L'AmB a provoqué une réorganisation structurelle des liposomes qui permettrait de le stabiliser davantage comme cela a déjà été démontré pour des liposomes de grande taille (180,182). Ces systèmes possèdent une structure membranaire stable qui n'a rien de comparable avec les formes agrégées de l'AmB seul en suspension dans un environnement hydrophile. Les liposomes constituent des vecteurs adaptés au ciblage du système réticulo-endothélial (183).

Les liposomes d'AmB formulés à base de DMPG et en l'absence de DMPC (rapport molaire 0 :2 :1) avec une structure multi-lamellaire offrent une meilleure encapsulation de la molécule active, de l'ordre de 80%. Ce taux élevé est relié à un assemblage fluide et mobile au niveau membranaire, caractéristique des systèmes plus instables et qui sera dépendant de la force ionique, de la technique de préparation et de la température.

Les liposomes (DMPC:DMPG:AmB) avec un rapport molaire 1 :9 :5 permettent de bien solubiliser l'AmB comme le montrent les expériences RMN ^1H et ^{31}P , sauf qu'ils sont plus rigides que les systèmes précédents (DMPG : AmB) mais plus fluides que les compositions (DMPC:DMPG) sans AmB. D'une manière générale, nous constatons que ces systèmes sont très proches des liposomes MLV (DMPG : AmB, 0 :2 :1) en termes de forte encapsulation d'AmB (environ 80%) et de temps réduit d'incorporation (τ_c) sauf qu'ils ne sont pas très homogènes.

Le système équimolaire (DMPC : DMPG : AmB) (rapport molaire 1 :1 :1) permet d'encapsuler environ 50% d'AmB en impliquant différents types d'association du principe actif avec les phospholipides DMPC et DMPG, comme le signale la présence de deux pics d'égale intensité au niveau du spectre RMN ^{31}P . Ce système se caractérise par une bicouche très fluide, pas très homogène et modifiée en termes de mobilité et d'organisation membranaire. Les résultats sont pratiquement identiques pour les liposomes de type MLV et pour ceux de type SUV, ce qui explique la capacité de l'AmB à s'intégrer au sein de cette

organisation structurale membranaire grâce à son affinité (184). Les résultats sont confirmés par l'électro-résonance magnétique où la mobilité moyenne est augmentée par une diminution de (τ_c), ce qui démontre la forte présence d'AmB. En conclusion, les liposomes formulés à base de phospholipides DMPG seront plus adaptés à une utilisation locale pulmonaire car la composition du fluide pulmonaire, contenant environ 10% de phospholipides DMPG, permettra d'intégrer plus facilement ces formes vectorisées chargées en AmB dans la région alvéolaire des poumons.

Dans une troisième partie du travail, nous avons développé des dispersions solides amorphes d'AmB à partir d'un excipient innovant très hydrophile : les polymères de cyclodextrines en vue de l'obtention d'une forme galénique adaptée à une administration par voie pulmonaire. Cette 4^{ème} et nouvelle génération de dispersions solides (DS 4.0) constitue une approche originale pour le développement d'une formulation médicamenteuse. Le procédé de synthèse breveté pour l'obtention de polymères de cyclodextrines (co-polymères α -CD, β -CD ou γ -CD, ter-polymères $\alpha\gamma$ -CD, $\beta\gamma$ -CD ou $\alpha\beta$ -CD et tétra-polymères $\alpha\beta\gamma$ -CD), tel que décrit par Skiba et al. (131), est simple, rapide, n'implique aucun solvant organique et est facilement transposable à l'échelle industrielle. La polymérisation des cyclodextrines naturelles est obtenue par une réaction de polycondensation par une méthode de fusion. Le caractère non toxique, biodégradable et biocompatible de ces nouveaux polymères de cyclodextrines permet leur utilisation dans le domaine pharmaceutique.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude de la solubilité de l'Amphotéricine B par complexation avec différents polymères de cyclodextrines selon la méthode d'Higuchi. La solubilité maximale en solution aqueuse des différents polymères de cyclodextrines est de l'ordre de 1g/ml, donc rien de comparable avec la limite de solubilité aqueuse des cyclodextrines naturelles ou modifiées. Nous avons pu multiplier la solubilité intrinsèque de l'AmB (1 μ g/mL) par des facteurs 450, 460 et 760 avec respectivement les ter-polymères $\alpha\gamma$ -CD, $\beta\gamma$ -CD et les co-polymères γ -CD. Cette amélioration de la solubilité de l'AmB est la conséquence d'une inclusion de la molécule active au sein des cavités hydrophobes des cyclodextrines. Des interactions intramoléculaires et électrostatiques ont été établies d'une part, entre les molécules d'AmB adjacentes par des liaisons de type hydrogène et d'autre part entre les groupements NH_3^+ et les groupements COO^- d'une autre molécule. De plus, une interaction dipôle-dipôle entre groupements NH_3^+ et COO^- a un impact mineur sur l'auto-assemblage de l'AmB dans la formation de dimères. L'hydrophobie de la molécule d'AmB

résulte de la longue chaîne d'alkyles de sept doubles liaisons conjuguées constituant le polyène. Cette partie hydrophobe diminue les interactions électrostatiques de l'AmB avec des molécules H₂O par la réduction des liaisons hydrogènes, même en dépit de la présence d'atomes d'hydrogène liés à des groupements polaires.

Notre stratégie consiste à empêcher ce phénomène, qui a un impact négatif sur la solubilité de l'AmB, en formant des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines. Cette complexation conduira à une substitution des molécules d'eau au sein de la cavité des cyclodextrines par des molécules d'AmB à travers des liaisons hydrogène ou des interactions de type Van der Waals et par la réduction des interactions intermoléculaires responsables de la faible solubilité. De plus, l'estérification des groupements hydroxyle, amine ou carboxyle de l'AmB, du fait de la présence de groupements COOH libres dans la structure polymérique, augmentera la solubilité (180).

A partir d'une suspension contenant jusqu'à 15% en charge d'Amphotéricine B dans une matrice binaire, nous avons obtenu des microparticules sèches par la technique de séchage par atomisation ou spray-drying. Nous avons optimisé les conditions opératoires afin d'étudier leur impact sur les caractéristiques des particules obtenues telles que la taille, la morphologie, l'humidité résiduelle, la dispersibilité et la mouillabilité.

La microscopie à balayage électronique a permis de visualiser la formation de dispersions solides amorphes sous forme de particules sphériques.

Nous avons mesuré par granulométrie laser le diamètre moyen des particules obtenues dans différentes conditions: après une simple dispersion de l'AmB dans une solution hydro-alcoolique puis atomisation par spray-drying, après réalisation de dispersions solides par spray-drying à partir d'une solution de polymères de cyclodextrines et d'AmB. Les dispersions solides conduisent à une réduction de taille importante du fait d'une meilleure solubilisation dans la matrice binaire. De plus, le faible diamètre moyen, compris entre 6 et 8 μm, permet d'améliorer nettement la mouillabilité des particules obtenues.

L'analyse calorimétrique à balayage différentiel (DSC) du mélange physique (AmB + poly γ -CD) a montré le déplacement du pic de fusion de l'AmB libre (T=174°C) à une plus basse température, ce qui peut correspondre dans ces conditions à une faible interaction entre le PA et le Poly γ -CD. Par contre, nous avons pu observer la formation d'une nouvelle entité à

travers l'apparition d'un pic de fusion suite à une interaction entre l'AmB et le réseau du copolymère γ -CD. La disparition du pic de fusion de l'AmB correspondant à son état cristallin pourrait traduire un changement vers un état amorphe. (185)

L'analyse thermogravimétrique (TGA) des dispersions solides amorphes sphériques (DSAS) a montré une perte de masse de 1.87%, comparativement aux mélanges physiques (5,6%) et à une solution de poly γ -CD (5,8%). Ce phénomène est expliqué par une substitution des molécules d'eau présentes dans les cavités de cyclodextrines et au sein du réseau polymérique par des molécules d'AmB. Ce phénomène de changement de comportement thermique démontre la formation d'un nouveau système et l'apparition de nouvelles interactions dans la matrice, contrairement au mélange physique où la perte d'eau est équivalente à celle du polymère γ -CD seul (186).

L'analyse spectroscopique infrarouge a révélé la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les molécules d'AmB. Une élancement de la bande d'absorption (ν OH) correspondante explique une association moléculaire polymérique provoquée par des liaisons intermoléculaires entre les dimères. Selon Skiba *et al*, c'est la preuve d'une polycondensation par une réaction d'estérification entre les groupements carboxyles des molécules d'acide citrique et les groupements hydroxyles des unités de cyclodextrines (118).

La diminution de la cristallinité de l'AmB dans la matrice serait la raison du déplacement de la bande d'absorption de la bande C=O de 1690cm^{-1} à 1719cm^{-1} (185). Un autre changement constaté est la nette diminution de la large bande à 3360cm^{-1} qui correspond à des liaisons hydrogènes présentes dans la forme libre du principe actif, ce qui suggère une bonne dispersion de l'AmB monomérique au sein des polymères de cyclodextrines.

Les résultats de la spectroscopie Raman confirment la présence d'une forme amorphe d'AmB dans la matrice polymérique. La comparaison des différents mélanges met en évidence des modifications dans les régions spectrales des vibrations polyéniques. La diminution de la fréquence d'absorption s'explique par la délocalisation du système électronique π et signifie la diminution de la cristallinité du principe actif (56,164,165).

Lors de l'étude de dissolution réalisée à l'aide d'un dissolutest, la comparaison des courbes obtenues à partir des formulations γ -CD et Poly- γ -CD donne des informations cruciales sur la distribution de l'AmB au sein de ces deux matrices différentes. Une libération complète

réalisée dans les 40 minutes a été observée pour les dispersions solides, ce qui montre une bonne dispersion monomérique de l'AmB dans la matrice, conséquence de la mise en jeu de fortes interactions entre l'AmB et Poly- γ -CD en raison de liaisons hydrogènes avec les groupements (-COOH) de l'acide citrique. En comparant la poudre d'AmB pur et les formulations de DSAS [Poly- $\beta\gamma$ ou Poly- $\alpha\gamma$ -CD] pour une même charge d'AmB (environ 15%), on obtient une complète dissolution après 45 minutes pour les DSAS. Les dispersions solides sous forme de particules de petite taille présentent une bonne mouillabilité au sein du milieu de dissolution, conduisent à un changement d'état qui diminue la cristallinité et empêche l'association moléculaire polyénique du fait d'une meilleure dispersion des monomères AmB au sein de la structure des polymères.

La mise en évidence d'une très légère interaction pour le mélange physique polymères de CD/AmB par la technique DSC, confirme l'importance du processus de séchage par atomisation (spray-drying®) au niveau du comportement de la dissolution des composés en termes d'élimination de l'humidité résiduelle et du changement d'un état cristallin à un état amorphe. L'importance de l'atomisation à haute pression et haute température a été confirmée par la dissolution rapide de l'AmB pur solubilisé puis atomisé par spray-drying® [56% atteint en 15min contre 30% seulement pour l'AmB non atomisé].

L'étude de la lyodiponibilité des dispersions solides est fortement influencée par le type du polymère utilisé et la composition en cyclodextrine(s) naturelle(s) ainsi que par les conditions expérimentales appliquées lors du séchage par atomisation. La transformation à un état amorphe par le technique d'atomisation (T=130°C) conduit à la substitution des molécules d'eau par des molécules d'amphotéricine B dans le réseau polymérique. De plus, les polymères de cyclodextrines permettent d'obtenir une distribution homogène du principe actif et d'empêcher une grande concentration d'agrégats.

Le traitement conventionnel des infections fongiques comme l'aspergillose pulmonaire invasive ou des mycoses profondes viscérales comme la leishmaniose viscérale, se fait principalement par perfusion intraveineuse de formulations lipidiques d'AmB. Cette voie parentérale montre cependant des limites du fait de l'irrégularité de l'effet des doses administrées à cause de l'interaction du polyène avec les protéines plasmatiques. Afin de remédier aux divers problèmes inhérents à la délivrance systémique de l'AmB, nous avons

opté pour le choix d'une administration pulmonaire via une inhalation de poudres sèches dans le but d'une délivrance locale ou d'un effet systémique.

Conclusion & Perspectives

Le traitement à base d'AmB contre l'aspergillose pulmonaire invasive et les leishmanioses montrent ses limites à travers une administration parentérale. D'autres voies, telles que la voie orale ou la voie pulmonaire, pourraient être plus adaptées pour garantir une meilleure utilisation de ce puissant agent antifongique et antiparasitaire.

Les infections fongiques pulmonaires touchent directement les zones les plus profondes du poumon et nécessitent l'administration de fortes doses médicamenteuses par voie systémique pour l'obtention d'un effet thérapeutique satisfaisant, mais non sans provoquer une toxicité importante.

La stratégie d'administrer l'AmB par voie orale, ou encore mieux par voie pulmonaire pour une action ciblée directement dans les poumons, pourrait permettre de diminuer la toxicité de cet antifongique par l'administration de plus faibles doses.

Les liposomes d'AmB, formes actuellement disponibles sur le marché, sont des vecteurs aptes à augmenter la perméabilité membranaire de ce principe actif, à permettre une bonne diffusion tissulaire et à assurer une meilleure distribution vers les organes et cellules. Néanmoins, ils nécessitent une injection intra-veineuse du fait de leur instabilité par voie orale et de leur rapide dégradation sous l'action des sucs digestifs et de l'effet des sels biliaires. Le développement de liposomes à base de céramides végétales pourrait permettre d'aboutir à une forme plus résistante dans le cadre d'une administration *per os* et plus adaptée pour le traitement de la leishmaniose viscérale.

Le concept d'élaborer des dispersions solides amorphes sphériques à partir de polymères de cyclodextrines très hydrosolubles aboutit à une nouvelle et quatrième génération de dispersions solides (DS 4.0). L'originalité de ces systèmes bi-fonctionnels est de combiner à la fois les propriétés spécifiques de complexation des cyclodextrines et un effet d'hydrophilisation de la molécule active hydrophobe par dispersion entre les cavités des cyclodextrines au sein de la matrice polymérique. La méthode de séchage par atomisation ou spray-drying appliquée dans le processus de fabrication des dispersions solides permet l'obtention de fines poudres sèches démontrant des caractéristiques physico-chimiques plus adaptées à la formulation médicamenteuse notamment en termes de solubilisation et de vitesse de dissolution du principe actif, conduisant ainsi à une meilleure biodisponibilité. Ces poudres sont compatibles aussi bien à un usage par voie orale que par inhalation.

Ces dernières années, l'administration pulmonaire a été d'un grand apport au domaine pharmaceutique visant un effet local mais aussi systémique, et cela pour un grand nombre de principe actifs très efficaces mais peu exploités du fait d'un certain nombre de

contraintes biologiques. L'utilisation de la voie pulmonaire pour administrer l'AmB sous forme d'aérosol sec via une inhalation constituerait une avancée majeure pour le traitement des diverses infections fongiques et en particulier pour l'aspergillose pulmonaire invasive.

En perspective, des études complémentaires seront nécessaires pour tester l'efficacité thérapeutique de ces formulations développées sur un modèle animal avant d'envisager une application potentielle clinique.

Références Bibliographiques

1. Denning DW. Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998 Apr 1;26(4):781–803.
2. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2001 Dec 1;33(11):1824–33.
3. Chen SCA, Sorrell TC. Antifungal agents. *Med J Aust*. 2007 Oct 1;187(7):404–9.
4. Rex JH, Walsh TJ. Editorial Response: Estimating the True Cost of Amphotericin B. *Clin Infect Dis*. 1999 Dec 1;29(6):1408–10.
5. Zu Y, Sun W, Zhao X, Wang W, Li Y, Ge Y, et al. Preparation and characterization of amorphous amphotericin B nanoparticles for oral administration through liquid antisolvent precipitation. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2014 Mar 12;53:109–17.
6. Prajapati VK, Awasthi K, Yadav TP, Rai M, Srivastava ON, Sundar S. An oral formulation of amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes is an effective treatment for experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2012 Jan 15;205(2):333–6.
7. Singh K, Tiwary AK, Rana V. Spray dried chitosan-EDTA superior microparticles as solid substrate for the oral delivery of amphotericin B. *Int J Biol Macromol*. 2013 Jul;58:310–9.
8. Yang Z, Chen M, Yang M, Chen J, Fang W, Xu P. Evaluating the potential of cubosomal nanoparticles for oral delivery of amphotericin B in treating fungal infection. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:327–36.
9. Wasan EK, Bartlett K, Gershkovich P, Sivak O, Banno B, Wong Z, et al. Development and characterization of oral lipid-based amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. *Int J Pharm*. 2009 May 8;372(1–2):76–84.
10. Jain S, Valvi PU, Swarnakar NK, Thanki K. Gelatin coated hybrid lipid nanoparticles for oral delivery of amphotericin B. *Mol Pharm*. 2012 Sep 4;9(9):2542–53.
11. Italia JL, Kumar MNVR, Carter KC. Evaluating the potential of polyester nanoparticles for per oral delivery of amphotericin B in treating visceral leishmaniasis. *J Biomed Nanotechnol*. 2012 Aug;8(4):695–702.
12. Zhang C, Gu C, Peng F, Liu W, Wan J, Xu H, et al. Preparation and optimization of triptolide-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery with reduced gastric irritation. *Mol Basel Switz*. 2013 Oct 29;18(11):13340–56.
13. Mathpal D, Garg T, Rath G, Goyal AK. Development and characterization of spray dried microparticles for pulmonary delivery of antifungal drug. *Curr Drug Deliv*. 2015;12(4):464–71.
14. Hartsel S, Bolard J. Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends Pharmacol Sci*. 1996 Dec;17(12):445–9.

15. Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci.* 2008 Jul;97(7):2405–25.
16. Espada R, Josa JM, Valdespina S, Dea MA, Ballesteros MP, Alunda JM, et al. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. *Biomed Chromatogr BMC.* 2008 Apr;22(4):402–7.
17. R. Serrano D, P. Ballesteros M, G. Schätzlein A, J. Torrado J, F. Uchegbu I. Amphotericin B Formulations – The Possibility of Generic Competition. *Pharm Nanotechnol.* 2013 Nov 1;1(4):250–8.
18. Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP, Torrado JJ. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm.* 2008 Sep 1;361(1–2):64–9.
19. NCCN practice guidelines for fever and neutropenia. National Comprehensive Cancer Network. *Oncol Williston Park N.* 1999 May;13(5A):197–257.
20. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet Lond Engl.* 1999 Oct 2;354(9185):1191–9.
21. Tamiru A, Tigabu B, Yifru S, Diro E, Hailu A. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B for treatment of complicated visceral leishmaniasis in patients without HIV, North-West Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2016 Oct 10;16(1):548.
22. Murray HW. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Dec;71(6):787–94.
23. Barratt G, Bretagne S. Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. *Int J Nanomedicine.* 2007 Sep;2(3):301–13.
24. Amato VS, Rabello A, Rotondo-Silva A, Kono A, Maldonado TPH, Alves IC, et al. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. *Acta Trop.* 2004 Oct;92(2):127–32.
25. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2002 Apr 1;34(7):909–17.
26. Netgen. Aspergillose pulmonaire invasive et aspergillose pulmonaire chronique [Internet]. *Revue Médicale Suisse.* [cited 2017 Sep 5]. Available from: <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-451/Aspergillose-pulmonaire-invasive-et-aspergillose-pulmonaire-chronique#anchor-B21>
27. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008 Feb 1;46(3):327–60.
28. Kawamura S, Maesaki S, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. Clinical evaluation of 61 patients with pulmonary aspergilloma. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2000 Mar;39(3):209–12.

29. Aspergilloma and residual tuberculous cavities--the results of a resurvey. *Tubercle*. 1970 Sep;51(3):227–45.
30. Sarosi GA, Silberfarb PM, Saliba NA, Huggin PM, Tosh FE. Aspergillomas occurring in blastomycotic cavities. *Am Rev Respir Dis*. 1971 Oct;104(4):581–4.
31. Rosenheim SH, Schwarz J. Cavitory pulmonary cryptococcosis complicated by aspergilloma. *Am Rev Respir Dis*. 1975 Apr;111(4):549–53.
32. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest*. 2002 Jun;121(6):1988–99.
33. Duret C. Développement et évaluation de poudres sèches pour inhalation à base d'itraconazole dans le cadre du traitement et de la prévention de l'aspergillose pulmonaire. 2013 Apr 19 [cited 2018 Feb 19]; Available from: <http://hdl.handle.net/2013/ULB-DIPOT:oai:dipot.ulb.ac.be:2013/209499>
34. Tsubura E. [Multicenter clinical trial of itraconazole in the treatment of pulmonary aspergilloma. Pulmonary Aspergilloma Study Group]. *Kekkaku*. 1997 Oct;72(10):557–64.
35. Kauffman CA. Quandary about treatment of aspergillomas persists. *Lancet Lond Engl*. 1996 Jun 15;347(9016):1640.
36. Giron J, Poey C, Fajadet P, Sans N, Fourcade D, Senac JP, et al. CT-guided percutaneous treatment of inoperable pulmonary aspergillomas: a study of 40 cases. *Eur J Radiol*. 1998 Oct;28(3):235–42.
37. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2013 Aug;43(8):850–73.
38. Proesmans M, Vermeulen F, Vreys M, De Boeck K. Use of nebulized amphotericin B in the treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Int J Pediatr*. 2010;2010:376287.
39. Limper AH, Knox KS, Sarosi GA, Ampel NM, Bennett JE, Catanzaro A, et al. An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jan 1;183(1):96–128.
40. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011 Sep 1;20(121):156–74.
41. Thompson GR, Patterson TF. Pulmonary aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2008 Apr;29(2):103–10.
42. Hruban RH, Meziane MA, Zerhouni EA, Wheeler PS, Dumler JS, Hutchins GM. Radiologic-pathologic correlation of the CT halo sign in invasive pulmonary aspergillosis. *J Comput Assist Tomogr*. 1987 Jun;11(3):534–6.

43. Corcoran TE, Venkataramanan R, Mihelc KM, Marcinkowski AL, Ou J, McCook BM, et al. Aerosol deposition of lipid complex amphotericin-B (Abelcet) in lung transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2006 Nov;6(11):2765–73.
44. Lipid Amphotericin B Formulations and the Echinocandins - ppt download [Internet]. [cited 2018 Feb 20]. Available from: <http://slideplayer.com/slide/774302/>
45. Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DR, et al. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2001 Mar 1;32(5):686–93.
46. Wingard JR, Kubilis P, Lee L, Yee G, White M, Walshe L, et al. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1999 Dec;29(6):1402–7.
47. Bagnis CI, Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity. *Saudi J Kidney Dis Transplant Off Publ Saudi Cent Organ Transplant Saudi Arab*. 2002 Dec;13(4):481–91.
48. Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*. 2009 Dec 31;26(4):223–7.
49. Formes pharmaceutiques nouvelles : aspects technologique, biopharmaceutique et médical BURI P., PUISIEUX F., DOELKER E., BENOIT J.-P. [Internet]. Librairie Lavoisier. [cited 2018 Feb 16]. Available from: <https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/formes-pharmaceutiques-nouvelles-aspects-technologique-biopharmaceutique-et-medical/buri/descriptif-9782852063099>
50. Lopez-Berestein G, Bodey GP, Fainstein V, Keating M, Frankel LS, Zeluff B, et al. Treatment of systemic fungal infections with liposomal amphotericin B. *Arch Intern Med*. 1989 Nov;149(11):2533–6.
51. Grant CW, Hamilton KS, Hamilton KD, Barber KR. Physical biochemistry of a liposomal amphotericin B mixture used for patient treatment. *Biochim Biophys Acta*. 1989 Aug 21;984(1):11–20.
52. Janknegt R, de Marie S, Bakker-Woudenberg IA, Crommelin DJ. Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. *Clinical pharmacokinetics*. *Clin Pharmacokinet*. 1992 Oct;23(4):279–91.
53. Leenders AC, de Marie S. The use of lipid formulations of amphotericin B for systemic fungal infections. *Leukemia*. 1996 Oct;10(10):1570–5.
54. Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. 1999 Dec;1(4):273–83.
55. Bowden R, Chandrasekar P, White MH, Li X, Pietrelli L, Gurwith M, et al. A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2002 Aug 15;35(4):359–66.

56. Hiemenz JW, Walsh TJ. Lipid Formulations of Amphotericin B: Recent Progress and Future Directions. *Clin Infect Dis*. 1996 May 1;22(Supplement 2):S133–44.
57. Jain JP, Kumar N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)(3)-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2010 Aug 11;40(5):456–65.
58. Vandermeulen G, Rouxhet L, Arien A, Brewster ME, Pr at V. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. *Int J Pharm*. 2006 Feb 17;309(1–2):234–40.
59. Chakraborty KK, Naik SR. Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin - beta complexed with different chemically modified beta - cyclodextrins. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Soc Can Sci Pharm*. 2003 Aug;6(2):231–7.
60. Longuet P, Joly V, Amirault P, Seta N, Carbon C, Yeni P. Limited protection by small unilamellar liposomes against the renal tubular toxicity induced by repeated amphotericin B infusions in rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Jul;35(7):1303–8.
61. Hostetler JS, Clemons KV, Hanson LH, Stevens DA. Efficacy and safety of amphotericin B colloidal dispersion compared with those of amphotericin B deoxycholate suspension for treatment of disseminated murine cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Dec;36(12):2656–60.
62. Wortmann G, Zapor M, Ressler R, Fraser S, Hartzell J, Pierson J, et al. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Nov;83(5):1028–33.
63. Hussain A, Singh VK, Singh OP, Shafaat K, Kumar S, Ahmad FJ. Formulation and optimization of nanoemulsion using antifungal lipid and surfactant for accentuated topical delivery of Amphotericin B. *Drug Deliv*. 2016 Oct;23(8):3101–10.
64. Interaction of amphotericin B with polymeric colloids: A spectroscopic study - ScienceDirect [Internet]. [cited 2017 Sep 10]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776598000332>
65. Espuelas MS, Legrand P, Campanero MA, Appel M, Ch eron M, Gamazo C, et al. Polymeric carriers for amphotericin B: in vitro activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Sep;52(3):419–27.
66. Otsubo T, Maesaki S, Hossain MA, Yamamoto Y, Tomono K, Tashiro T, et al. In vitro and in vivo activities of NS-718, a new lipid nanosphere incorporating amphotericin B, against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Mar;43(3):471–5.
67. Nagata M, Yotsuyanagi T, Ikeda K. A two-step model of disintegration kinetics of liposomes in bile salts. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1988 Apr;36(4):1508–13.

68. Whateley TL. Drug Delivery and Targeting; for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. *J Drug Target*. 2002 Jan 1;10(8):637–637.
69. Ménez C, Buyse M, Besnard M, Farinotti R, Loiseau PM, Barratt G. Interaction between Miltefosine and Amphotericin B: Consequences for Their Activities towards Intestinal Epithelial Cells and *Leishmania donovani* Promastigotes In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Nov;50(11):3793–800.
70. Venier-Julienne MC, Vouldoukis I, Monjour L, Benoit JP. In vitro study of the anti-leishmanial activity of biodegradable nanoparticles. *J Drug Target*. 1995;3(1):23–9.
71. Kumar R, Sahoo GC, Pandey K, Das V, Das P. Study the effects of PLGA-PEG encapsulated amphotericin B nanoparticle drug delivery system against *Leishmania donovani*. *Drug Deliv*. 2015 May;22(3):383–8.
72. Mansour HM, Rhee Y-S, Wu X. Nanomedicine in pulmonary delivery. *Int J Nanomedicine*. 2009;4:299–319.
73. Ruijgrok EJ, Vulto AG, Van Etten EW. Efficacy of aerosolized amphotericin B desoxycholate and liposomal amphotericin B in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in severely immunocompromised rats. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Jul;48(1):89–95.
74. Al-Nakeeb Z, Sudan A, Jeans AR, Gregson L, Goodwin J, Warn PA, et al. Pharmacodynamics of itraconazole against *Aspergillus fumigatus* in an in vitro model of the human alveolus: perspectives on the treatment of triazole-resistant infection and utility of airway administration. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Aug;56(8):4146–53.
75. Paquet V, Carreira EM. Significant Improvement of Antifungal Activity of Polyene Macrolides by Bisalkylation of the Mycosamine. *Org Lett*. 2006 Apr 1;8(9):1807–9.
76. Mathias NR, Hussain MA. Non-invasive systemic drug delivery: developability considerations for alternate routes of administration. *J Pharm Sci*. 2010 Jan;99(1):1–20.
77. Mukherjee B, Paul P, Dutta L, Chakraborty S, Dhara M, Mondal L, et al. Chapter 14 - Pulmonary Administration of Biodegradable Drug Nanocarriers for More Efficacious Treatment of Fungal Infections in Lungs: Insights Based on Recent Findings. In: Grumezescu AM, editor. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* [Internet]. Elsevier; 2017. p. 261–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323527255000149>
78. Leenders AC, de Marie S, ten Kate MT, Bakker-Woudenberg IA, Verbrugh HA. Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection as compared with amphotericin B deoxycholate (Fungizone) in a rat model of pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*. 1996 Aug;38(2):215–25.
79. Lê VNP. Influence des propriétés physicochimiques du principe actif et du transporteur sur la performance aérodynamique des mélanges de poudre pour inhalation [Internet] [phdthesis]. Université du Droit et de la Santé - Lille II; 2011 [cited 2018 Feb 16]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00647318/document>

80. Warolin C. Un historique des formes galéniques : Liliane Pariente, Naissance et évolution de quinze formes pharmaceutiques. *Rev Hist Pharm.* 1997;85(313):80–4.
81. Wauthoz N, Deleuze P, Saumet A, Duret C, Kiss R, Amighi K. Temozolomide-based dry powder formulations for lung tumor-related inhalation treatment. *Pharm Res.* 2011 Apr;28(4):762–75.
82. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J.* 1999 Jun;13(6):1455–76.
83. Kakade PP, Versteeg HK, Hargrave GK, Genova P, Williams Iii RC, Deaton D. Design optimization of a novel pMDI actuator for systemic drug delivery. *J Aerosol Med Off J Int Soc Aerosols Med.* 2007;20(4):460–74.
84. Wauthoz N. Développement et évaluation de formulations pour inhalation à base d'anticancéreux dans le cadre du traitement des tumeurs pulmonaires. 2011 Dec 7 [cited 2018 Feb 19]; Available from: <http://hdl.handle.net/2013/ULB-DIPOT:oai:dipot.ulb.ac.be:2013/209814>
85. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm.* 2010 Jun 15;392(1–2):1–19.
86. Duret C, Merlos R, Wauthoz N, Sebti T, Vanderbist F, Amighi K. Pharmacokinetic evaluation in mice of amorphous itraconazole-based dry powder formulations for inhalation with high bioavailability and extended lung retention. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2014 Jan;86(1):46–54.
87. Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol.* 2003 Dec;56(6):588–99.
88. Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992 Feb;6(2):235–43.
89. Shen Z, Zhang Q, Wei S, Nagai T. Proteolytic enzymes as a limitation for pulmonary absorption of insulin: in vitro and in vivo investigations. *Int J Pharm.* 1999 Dec 10;192(2):115–21.
90. Forbes B, Wilson CG, Gumbleton M. Temporal dependence of ectopeptidase expression in alveolar epithelial cell culture: implications for study of peptide absorption. *Int J Pharm.* 1999 Apr;180(2):225–34.
91. Byron PR. Prediction of drug residence times in regions of the human respiratory tract following aerosol inhalation. *J Pharm Sci.* 1986 May;75(5):433–8.
92. Patton JS. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996 Apr 30;19(1):3–36.
93. Gorin AB, Stewart PA. Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux. *J Appl Physiol.* 1979 Dec;47(6):1315–24.

94. Cevc G. Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1996;13(3–4):257–388.
95. Klonoff DC. Inhaled insulin. *Diabetes Technol Ther.* 1999;1(3):307–13.
96. Laube BL, Benedict GW, Dobs AS. Time to peak insulin level, relative bioavailability, and effect of site of deposition of nebulized insulin in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Aerosol Med Off J Int Soc Aerosols Med.* 1998;11(3):153–73.
97. Marks JD, Luce JM, Lazar NM, Wu JN, Lipavsky A, Murray JF. Effect of increases in lung volume on clearance of aerosolized solute from human lungs. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1985 Oct;59(4):1242–8.
98. Becker RHA, Sha S, Frick AD, Fountaine RJ. The Effect of Smoking Cessation and Subsequent Resumption on Absorption of Inhaled Insulin. *Diabetes Care.* 2006 Feb 1;29(2):277–82.
99. Henry RR, Mudaliar SRD, Howland WC, Chu N, Kim D, An B, et al. Inhaled insulin using the AERx Insulin Diabetes Management System in healthy and asthmatic subjects. *Diabetes Care.* 2003 Mar;26(3):764–9.
100. Hochman J, Artursson P. Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J Controlled Release.* 1994 Mar 1;29(3):253–67.
101. Heidemann HT, Gerken JF, Spickard WA, Jackson EK, Branch RA. Amphotericin B nephrotoxicity in humans decreased by salt repletion. *Am J Med.* 1983 Sep;75(3):476–81.
102. Yamamoto A, Tanaka H, Okumura S, Shinsako K, Ito M, Yamashita M, et al. Evaluation of insulin permeability and effects of absorption enhancers on its permeability by an in vitro pulmonary epithelial system using *Xenopus* pulmonary membrane. *Biol Pharm Bull.* 2001 Apr;24(4):385–9.
103. Laube BL. The expanding role of aerosols in systemic drug delivery, gene therapy, and vaccination. *Respir Care.* 2005 Sep;50(9):1161–76.
104. M. Skiba, M. Lahiani-Skiba. . (M. Skiba, M. Lahiani-Skiba, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem, 2012, 75:341-349.). 2012;341–9.
105. Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm.* 2013 Aug 30;453(1):167–80.
106. Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2007 Feb 1;329(1):1–11.
107. Dutet J, Lahiani-Skiba M, Didier L, Jezequel S, Bounoure F, Barbot C, et al. Nimesulide/cyclodextrin/PEG 6000 ternary complexes: physico-chemical characterization, dissolution studies and bioavailability in rats. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2007 Apr 1;57(1–4):203–9.

108. Järvinen T, Järvinen K, Schwarting N, Stella VJ. β -Cyclodextrin Derivatives, SBE4- β -CD and HP- β -CD, Increase the Oral Bioavailability of Cinnarizine in Beagle Dogs. *J Pharm Sci.* 1995 Mar 1;84(3):295–9.
109. Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev.* 1998 Jul 30;98(5):1743–54.
110. Moyano JR, Arias MJ, Ginés JM, Pérez JI, Rabasco AM. Dissolution Behavior of Oxazepam in Presence of Cyclodextrins: Evaluation of Oxazepam-Dimeb Binary Systemxs. *Drug Dev Ind Pharm.* 1997 Jan 1;23(4):379–85.
111. Palmieri GF, Galli-Angeli D, Giovannucci G, Martelli S. Inclusion of Methoxybutropate in β -and Hydroxypropyl β -Cyclodextrins: Comparison of Preparation Methods. *Drug Dev Ind Pharm.* 1997 Jan 1;23(1):27–37.
112. Palmieri GF, Wehrlé P, Stamm A. Inclusion of Vitamin D2 in β -Cyclodextrin. Evaluation of Different Complexation Methods. *Drug Dev Ind Pharm.* 1993 Jan 1;19(8):875–85.
113. Fatmi S, Bournine L, Iguer-Ouada M, Lahiani-Skiba M, Bouchal F, Skiba M. Amorphous solid dispersion studies of camptothecin-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000. *Acta Pol Pharm.* 2015 Feb;72(1):179–92.
114. Pose-Vilarnovo B, Perdomo-López I, Echezarreta-López M, Schroth-Pardo P, Estrada E, Torres-Labandeira JJ. Improvement of water solubility of sulfamethizole through its complexation with beta- and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. Characterization of the interaction in solution and in solid state. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2001 Jun;13(3):325–31.
115. Castillo JA, Palomo-Canales J, Garcia JJ, Lastres JL, Bolas F, Torrado JJ. Preparation and characterization of albendazole beta-cyclodextrin complexes. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999 Dec;25(12):1241–8.
116. Díaz D, Escobar Llanos CM, Bernad Bernad MJ. Study of the binding in an aqueous medium of inclusion complexes of several cyclodextrins involving fenopufen calcium. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999 Jan;25(1):107–10.
117. Wulff M, Aldén M. Solid state studies of drug-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000 prepared by a new method. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 1999 Aug;8(4):269–81.
118. Ren X, Xue Y, Liu J, Zhang K, Zheng J, Luo G, et al. A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathione peroxidase activity. *Chembiochem Eur J Chem Biol.* 2002 Apr 2;3(4):356–63.
119. Loftsson T, Vogensen SB, Brewster ME, Konrádsdóttir F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J Pharm Sci.* 2007 Oct;96(10):2532–46.
120. Loftsson T, Konrádsdóttir F, Másson M. Influence of aqueous diffusion layer on passive drug diffusion from aqueous cyclodextrin solutions through biological membranes. *Pharm.* 2006 Feb;61(2):83–9.

121. Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm.* 2001 Aug 28;225(1–2):15–30.
122. Bouchal F, Skiba M, Chaffai N, Hallouard F, Fatmi S, Lahiani-Skiba M. Fast dissolving cyclodextrin complex of piroxicam in solid dispersion part I: influence of β -CD and HP β -CD on the dissolution rate of piroxicam. *Int J Pharm.* 2015 Jan 30;478(2):625–32.
123. Higuchi & Connors. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Inst.*, 4, 117-211, 1965. 1965;117–211.
124. Rajagopalan N, Chen SC, Chow W-S. A study of the inclusion complex of amphotericin-B with γ -cyclodextrin. *Int J Pharm.* 1986 Apr;29(2–3):161–8.
125. Serrano DR, Ruiz-Saldaña HK, Molero G, Ballesteros MP, Torrado JJ. A novel formulation of solubilised amphotericin B designed for ophthalmic use. *Int J Pharm.* 2012 Nov 1;437(1–2):80–2.
126. Jansook P, Loftsson T. CDs as solubilizers: effects of excipients and competing drugs. *Int J Pharm.* 2009 Sep 8;379(1):32–40.
127. Vikmon M, Stadler-Szöke A, Szejtli J. Solubilization of amphotericin B with gamma-cyclodextrin. *J Antibiot (Tokyo).* 1985 Dec;38(12):1822–4.
128. Ruiz HK, Serrano DR, Dea-Ayuela MA, Bilbao-Ramos PE, Bolás-Fernández F, Torrado JJ, et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp. *Int J Pharm.* 2014 Oct 1;473(1–2):148–57.
129. Kim Y-T, Shin B-K, Garripelli VK, Kim J-K, Davaa E, Jo S, et al. A thermosensitive vaginal gel formulation with HPgammaCD for the pH-dependent release and solubilization of amphotericin B. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2010 Oct 9;41(2):399–406.
130. Chakraborty KK, Naik SR. PHARMACOKINETIC STUDIES OF IN-SITU LIPOSOMAL PREPARATION CONTAINING AMPHOTERICIN B COMPLEXED WITH DIFFERENT CHEMICALLY MODIFIED beta-CYCLODEXTRINS. *J Liposome Res.* 2001;11(1):1–14.
131. Skiba M, Lahiani-Skiba M. Novel method for preparation of cyclodextrin polymers: physico-chemical characterization and cytotoxicity. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2013 Apr 1;75(3–4):341–9.
132. Taher Boukhris, Malika. Lahiani-Skiba, Mohamed Skiba. Novel oral formulation of cyclosporine-spray-dried dispersion using cyclodextrin copolymers. *Dig J Nanomater Biostructures.* 2012 Mar;Vol. 7, 2012,(No. 1):143–54.
133. Joudieh S, Bon P, Martel B, Skiba M, Lahiani-Skiba M. Cyclodextrin polymers as efficient solubilizers of albendazole: complexation and physico-chemical characterization. *J Nanosci Nanotechnol.* 2009 Jan;9(1):132–40.

134. S.Joudieh , M. Lahiani-Skiba et al. S.Joudieh , M. Lahiani-Skiba et al, Letters in Drug Design and Discovery, vol , N°6, 2008,. Letters in Drug Design and Discovery. 2008;406–15.
135. Goldberg AH, Gibaldi M, Kanig JL. Increasing Dissolution Rates and Gastrointestinal Absorption of Drugs Via Solid Solutions and Eutectic Mixtures I. J Pharm Sci. 1965 Aug 1;54(8):1145–8.
136. Kriek R. Palmitoylethanolamide: problems regarding micronization, ultra-micronization and additives. Inflammopharmacology. 2014 Jun;22(3):195–8.
137. Leleux J, Williams RO. Recent advancements in mechanical reduction methods: particulate systems. Drug Dev Ind Pharm. 2014 Mar;40(3):289–300.
138. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Zhou L, Li X, et al. Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs. Pharm Res. 2013 Feb;30(2):307–24.
139. Vo CL-N, Park C, Lee B-J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV. 2013 Nov;85(3 Pt B):799–813.
140. Taylor LS, Zografi G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. Pharm Res. 1997 Dec;14(12):1691–8.
141. Ghaderi R, Artursson P, Carlfors J. Preparation of biodegradable microparticles using solution-enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). Pharm Res. 1999 May;16(5):676–81.
142. Wehrlé P, Collectif. Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique. 2e édition. Paris: Maloine; 2012. 360 p.
143. Sekiguchi K, Obi N, Ueda Y. STUDIES ON ABSORPTION OF EUTECTIC MIXTURE. II. ABSORPTION OF FUSED CONGLOMERATES OF CHLORAMPHENICOL AND UREA IN RABBITS. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1964 Feb;12:134–44.
144. Full text of “Physical Chemistry (4th.ed.)” [Internet]. [cited 2017 Apr 4]. Available from: https://archive.org/stream/PhysicalChemistry4th.ed./Moore-PhysicalChemistry_djvu.txt
145. Vilhelmsen T, Eliassen H, Schaefer T. Effect of a melt agglomeration process on agglomerates containing solid dispersions. Int J Pharm. 2005 Oct 13;303(1–2):132–42.
146. Chiou WL, Riegelman S. Preparation and dissolution characteristics of several fast-release solid dispersions of griseofulvin. J Pharm Sci. 1969 Dec;58(12):1505–10.
147. Simonelli AP, Mehta SC, Higuchi WI. Dissolution Rates of High Energy Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Sulfathiazole Coprecipitates. J Pharm Sci. 1969 May 1;58(5):538–49.

148. Brough C, Williams RO. Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. *Int J Pharm.* 2013 Aug 30;453(1):157–66.
149. Vo CL-N, Park C, Lee B-J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2013 Nov;85(3 Pt B):799–813.
150. Jagdale S, Patil S, Kuchekar B, Chabukswar A. Preparation and Characterization of Metformin Hydrochloride — Compritol 888 ATO Solid Dispersion. *J Young Pharm JYP.* 2011;3(3):197–204.
151. Boukhris T, Lahiani-Skiba M, Martin D, Skiba M. Pre-formulation of an oral cyclosporine free of surfactant. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2012 Jun 20;75(3–4):323–32.
152. Linn M, Collnot E-M, Djuric D, Hempel K, Fabian E, Kolter K, et al. Soluplus® as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs in vitro and in vivo. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2012 Feb 14;45(3):336–43.
153. Verhoeven E, De Beer TRM, Schacht E, Van den Mooter G, Remon JP, Vervaet C. Influence of polyethylene glycol/polyethylene oxide on the release characteristics of sustained-release ethylcellulose mini-matrices produced by hot-melt extrusion: in vitro and in vivo evaluations. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2009 Jun;72(2):463–70.
154. Paudel A, Worku ZA, Meeus J, Guns S, Van den Mooter G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *Int J Pharm.* 2013 Aug 30;453(1):253–84.
155. Jang D-J, Sim T, Oh E. Formulation and optimization of spray-dried amlodipine solid dispersion for enhanced oral absorption. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013 Jul;39(7):1133–41.
156. Maa Y-F, Nguyen P-A, Sweeney T, Shire SJ, Hsu CC. Protein Inhalation Powders: Spray Drying vs Spray Freeze Drying. *Pharm Res.* 1999 Feb;16(2):249–54.
157. Jin-Chul Kim J-DK. Preparation by Spray Drying of Amphotericin B-Phospholipid Composite Particles and Their Anticellular Activity. *Drug Deliv.* 2001 Jan 1;8(3):143–7.
158. Yamaguchi M, Ohta A, Tsunematsu T, Kasukawa R, Mizushima Y, Kashiwagi H, et al. Preliminary criteria for classification of adult Still's disease. *J Rheumatol.* 1992 Mar;19(3):424–30.
159. PJ A. Dry powder inhalers: an overview. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2018 Feb 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16185366>
160. -Gautier C., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'guyen-Huu,, J.J. et Russotto, R. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I- Méthodologie. *STP Pharma Prat.* 1992;2(4):205–226.

161. ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the registration of pharmaceuticals for human use: Validation of analytical procedures: Q2A, Q2B. 2006;Q2A, Q2B.
162. Morris GA, Jeremy K. M. Sanders and Brian K. Hunter. *Modern NMR spectroscopy: A guide for chemists*. Oxford University Press, Oxford, 2nd edition, 1993, softback, 314 pp., £23.50. ISBN 0 19 855567 9. *Magn Reson Chem*. 1993 Dec 1;31(12):1096–1096.
163. Matsoukas J, Mavromoustakos T. *Bioactive Peptides in Drug Discovery and Design: Medical Aspects*. IOS Press; 1999. 312 p.
164. Carino SR, Sperry DC, Hawley M. Relative bioavailability estimation of carbamazepine crystal forms using an artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci*. 2006 Jan;95(1):116–25.
165. Marques MRC, Loebenberg R, Almukainzi M. *Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing*. [cited 2016 Nov 7]; Available from: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201108Articles/DT201108_A02.pdf
166. Hallouard F, Mehenni L, Lahiani-Skiba M, Anouar Y, Skiba M. Solid Dispersions for Oral Administration: An Overview of the Methods for their Preparation. *Curr Pharm Des*. 2016 Jul 25;
167. Dufourc EJ, Smith IC, Jarrell HC. Interaction of amphotericin B with membrane lipids as viewed by 2H-NMR. *Biochim Biophys Acta*. 1984 Dec 19;778(3):435–42.
168. Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, Perfect JR, Horwith G, Lee L, et al. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1998 Jun;26(6):1383–96.
169. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013 Feb 22;8(1):102.
170. Dhule SS, Penfornis P, He J, Harris MR, Terry T, John V, et al. The combined effect of encapsulating curcumin and C6 ceramide in liposomal nanoparticles against osteosarcoma. *Mol Pharm*. 2014 Feb 3;11(2):417–27.
171. McIntosh TJ. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 1978 Oct 19;513(1):43–58.
172. Lee S-C, Lee K-E, Kim J-J, Lim S-H. The Effect of Cholesterol in the Liposome Bilayer on the Stabilization of Incorporated Retinol. *J Liposome Res*. 2005 Jan 1;15(3–4):157–66.
173. Fujii Y, Aramaki Y, Hara T, Yachi K, Kikuchi H, Tsuchiya S. Enhancement of systemic and mucosal immune responses following oral administration of liposomes. *Immunol Lett*. 1993 Apr;36(1):65–9.
174. Aramaki Y, Tomizawa H, Hara T, Yachi K, Kikuchi H, Tsuchiya S. Stability of liposomes in vitro and their uptake by rat Peyer's patches following oral administration. *Pharm Res*. 1993 Aug;10(8):1228–31.

175. Sundar S, Mehta H, Suresh AV, Singh SP, Rai M, Murray HW. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2004 Feb 1;38(3):377–83.
176. Johnson PC, Wheat LJ, Cloud GA, Goldman M, Lancaster D, Bamberger DM, et al. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B compared with conventional amphotericin B for induction therapy of histoplasmosis in patients with AIDS. *Ann Intern Med.* 2002 Jul 16;137(2):105–9.
177. Larabi M, Pages N, Pons F, Appel M, Gulik A, Schlatter J, et al. Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jan 1;53(1):81–8.
178. Gorenstein DG, Lai K, Shah DO. 31P and two-dimensional 31P/1H correlated NMR spectra of Duplex d(Ap[17O]Gp[18O]Cp[16O]T) and assignment of 31P signals in d(ApGpCpT)-actinomycin D complex. *Biochemistry (Mosc).* 1984 Dec 18;23(26):6717–23.
179. Bloembergen N, Morgan LO. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *J Chem Phys.* 2004 Aug 6;34(3):842.
180. Gagoś M, Arczewska M. Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2010 Nov;1798(11):2124–30.
181. Gagoś M, Kamiński D, Arczewska M, Krajnik B, Maćkowski S. Spectroscopic evidence for self-organization of N-iodoacetyl amphotericin B in crystalline and amorphous phases. *J Phys Chem B.* 2012 Oct 25;116(42):12706–13.
182. Oliveira TR, Benatti CR, Lamy MT. Structural characterization of the interaction of the polyene antibiotic Amphotericin B with DODAB bicelles and vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Nov;1808(11):2629–37.
183. Loew S, Fahr A, May S. Modeling the release kinetics of poorly water-soluble drug molecules from liposomal nanocarriers. *J Drug Deliv.* 2011;2011:376548.
184. Lopez-Berestein G, Rosenblum MG, Mehta R. Altered tissue distribution of amphotericin B by liposomal encapsulation: comparison of normal mice to mice infected with *Candida albicans*. *Cancer Drug Deliv.* 1984;1(3):199–205.
185. Nadia A.Hussein Al-Assady, Inaam M. N. Alrubayae*, Eman Saad. Preparation ,Characterization and Evaluation of controlled release microspheres Containing Amphotericin B. 39th ed. 2013; Available from: <http://www.basra-science-journal.org/cont39A3/10.pdf>
186. Vianna RFL, Bentley MVLB, Ribeiro G, Carvalho FS, Neto AF, de Oliveira DCR, et al. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with corticosteroids: their characterization and stability. *Int J Pharm.* 1998 Jun 1;167(1–2):205–13.
187. Bunow MR, Levin IW. Vibrational raman spectra of lipid systems containing amphotericin B. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1977 Jan 4;464(1):202–16.

RESUME

Les infections fongiques peuvent s'exprimer sous différentes formes (leishmaniose cutanée ou viscérale, aspergillose pulmonaire à caractère allergique ou invasive) et connaissent une recrudescence dans les pays développés en affectant principalement les personnes immunodéprimées comme les cancéreux, les malades ayant subis des greffes d'organes ou les patients atteints du VIH. Ces infections sont une cause de mortalité chez 30% des sujets atteints. L'approche médicamenteuse conventionnelle consiste en l'administration par voie intraveineuse (IV) d'antifongiques. L'Amphotéricine B (AmB), un antibiotique de la famille des polyènes, reste à ce jour l'un des agents les plus efficaces dans le traitement des infections fongiques systémiques mais entraîne aussi des effets indésirables comme une néphrotoxicité aigüe après injection. Pour améliorer l'index thérapeutique de cette molécule active, nous avons développé différents outils galéniques adaptés à d'autres voies d'administration. Dans un premier temps, nous avons mis au point des liposomes à base de céramides végétales, adaptés pour une administration orale et dans le but de traiter la leishmaniose viscérale. Ces liposomes ont été testés dans un modèle *in vitro* Estomac/Duodénum pour mimer les conditions physiologiques et ont montré une bonne stabilité dans un tel milieu avec un taux d'encapsulation satisfaisant. Des liposomes formulés à partir de Dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC)/ Dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG) et encapsulant l'AmB ont été étudiés à l'aide de la résonance magnétique nucléaire (RMN³¹P et ¹H) et par résonance paramagnétique électronique (RPE). Ces liposomes, dont la composition pourrait être adaptée pour une administration par voie pulmonaire, ont été utilisés comme modèle membranaire pour une étude des interactions du principe actif dans la matrice liposomale. Enfin, nous décrivons le développement et la caractérisation physico-chimique d'une nouvelle génération de dispersions solides amorphes sphériques formulées à base de polymères de cyclodextrines très hydrophiles et d'amphotéricine B. Les formulations ont été obtenues sous forme de poudre sèche par spray-drying, une méthode de séchage par atomisation. Ces systèmes ont été caractérisés par diverses techniques : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), spectroscopie Raman, granulométrie laser, microscopie électronique à transmission et microscopie électronique à balayage. La distribution aérodynamique de ces dispersions solides amorphes a été évaluée à l'aide d'un impacteur à cascades afin de tester leur intérêt pour des applications potentielles par voie pulmonaire.

ABSTRACT

Fungal infections can be expressed in various forms (cutaneous or visceral leishmaniasis, allergic or invasive pulmonary aspergillosis) and increased in developing nations, mainly affecting immunocompromised persons such as patients having cancer, transplant organ or suffering from AIDS. These infections cause the death of 30% of affected individuals. The classical treatment approach is intravenous (IV) administration of antifungals. Amphotericin B (AmB) is an antibiotic of the polyene family, currently considered as one of the most effective agents in the treatment of systemic fungal infections but which also causes adverse effects such as acute nephrotoxicity post injection. To improve the therapeutic index of this active molecule, we have developed liposomes based on ceramides, suitable for oral administration and for the treatment of visceral leishmaniasis. These liposomes showed a high encapsulation rate and when they were tested in an *in-vitro* Stomach/Duodenum model to mimic physiological conditions, they were stable in such an environment. AmB-based liposomes formulated from Dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC)/ Dimyristoyl-phosphatidylglycerol (DMPG) were studied both by nuclear magnetic resonance (³¹P and ¹H NMR) and electron paramagnetic resonance (EPR). These liposomes whose composition could be adapted for pulmonary administration, have been used as membrane model to study interactions between active ingredient and liposomal matrix. To conclude, we describe a new generation of spherical amorphous solid dispersions developed from cyclodextrin-based polymers. The formulations were obtained in the form of dry powder by a spray-drying method. Several techniques were used to characterize the solid dispersions as Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Raman spectroscopy, laser granulometry, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy (SEM). The aerodynamic distribution of these amorphous solid dispersions was evaluated using a next generation cascading impactor (NGI®) to prove their interest in potential applications through a pulmonary route.