



F1000095439B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT
C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 12 02 1996

95439

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

A 61K 9/127, 47/44, 9/50, B 01J 13/02

(21) Patentihakemus - Patentansökning	880841
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	23.02.88
(24) Alkupäivä - Löpdag	23.02.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	24.08.88
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.10.95
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
23.02.87 GB 8704171 P	

(71) Hakija - Sökande

1. DepoTech Corporation, 11025 North Torrey Pines Road, Suite 100, La Jolla, CA 92037, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Howell, Stephen Barnard, 13612 Nogales Drive, Del Mar, CA 92014, USA, (US)
2. Kim, Sinil, 4016 Camino Calma, San Diego, CA 92122, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä biologisesti aktiivisten multivesikulaaristen lipidivesikkeleiden tai liposomien valmistamiseksi
Förfarande för framställning av biologiskt aktiva multivesikulära lipidvesiklar eller liposomer

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 4224179 (B 01J 13/02),
Biochemica et biophysica Acta, vol. 728, 1983, pp 339-348; Kim et al:
Preparation of multivesicular liposomes

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää multivesikulaaristen lipidivesikke-
lien tai liposomien valmistamiseksi. Menetelmä käsittää lipidi-
komponentin liuottamisen haihtuviin orgaanisiin liuottimiin,
sekoittumattoman hydrokloridia ja yhtä tai useampaa kapseloi-
tavaa biologisesti aktiivista ainetta sisältävän vesikomponen-
tin lisäämisen, vesi-öljy-emulsion muodostamisen kahdesta kompo-
nentista, emulsion upottamisen toiseen vesikomponenttiin, emul-
sion jakamisen pieniin liuotinpalloisiin, jotka sisältävät vielä-
kin pienempiä vesikammioita ja sitten liuottimien haihduttami-
sen biologisesti aktiivisia aineita sisältävien multivesikulaa-
risten liposomien muodostaman vesisuspension saamiseksi.
Keksintö koskee myös kyseisiä multivesikulaaarisia liposomeja.

Uppfinningen berör ett förfarande för framställning av multi-
vesikulära lipidvesiklar eller liposomer. Förfarandet innebär
att lipidkomponenterna löses i flyktiga organiska lösningsmedel,
en oblandad vattenkomponent innehållande hydroklorid och ett
eller flere biologiskt aktiva ämnen, som skall inkapslas till-
sätts, en vatten i olja-emulsion bildas av de två komponenter-
na, emulsionen sänks ned i en annan vattenkomponent, emulsionen
fördelas i små bollar av lösningsmedel, vilka innehåller ännu
mindre vattenkammrar, och därefter avdunstar lösningsmedlet för
att erhålla multivesikulära liposomer innehållande biologiskt
aktiva ämnen. Uppfinningen berör också ifrågavarande multivesi-
kulära liposomer.

Menetelmä biologisesti aktiivisten multivesikulaaristen lipidivesikkeleiden tai liposomien valmistamiseksi

5 Keksintö koskee menetelmää keinotekkoisten multivesikulaaristen lipidivesikkeleiden tai liposomien valmistamiseksi, joihin on kapseloitu biologisesti aktiivisia aineita.

10 Multivesikulaariset liposomit ovat yksi kolmesta liposomien päätyypistä. Niitä valmistivat ensimmäisenä Kim et al. (1983, Biochim. Biophys. Acta 782, 339 - 348), ja ne eroavat erikoisesti unilamellaarisista (Huang, 1969, Biochemistry 8, 334 - 352; Kim et al., 1981, Biochim. Biophys. Acta 646, 1 - 10) ja multilamellaarisista (Bangham et al., 1965, J. Mol. Biol. 13, 238 - 252) liposomeista
15 siinä, että ne sisältävät useita ei-samakeskisiä vesikamioita. Alalla on aiemmin kuvattu monia tekniikoita liposomien tuottamiseksi, mutta kaikki nämä tekniikat koskevat ei-multivesikulaaristen liposomien tuottamista: esimerkiksi Lenkin US-patentti nro 4 522 803, Baldeschwielerin 4 310 506, Papahadjopoulos'in 4 235 871, Schneiderin 4 224 179, Papahadjopoulos'in 4 078 052, Taylorin 4 394 372, Marchettin 4 308 166, Mezein 4 485 054 ja Redziniakin 4 508 703 kaikki kuvaavat ei-multivesikulaarisia vesikkeleitä. Liposomien valmistuksen eri menetelmien
20 laajaa katsausta varten katso Szoka et al., 1980, Ann. Rev. Bioeng. 9 467 - 508.

30 Kim et al.'n (1983, Biochim. Biophys. Acta 782, 339 - 348) menetelmä on ainoa raportti, joka kuvaa multivesikulaarisia liposomeja, mutta joidenkin pienten molekyylien, kuten ara-C:n, kapselointitehokkuus oli suhteellisen alhainen ja kapseloitujen molekyylien vuotonopeus biologisessa nesteessä oli korkea.

35 Monilla lääkkeillä optimaalinen käsittely vaatii lääkkeen tason ylläpitämisen pidennetyn ajanjakson ajan. Esimerkiksi optimaalinen syövänvastainen hoito solusykli-

spesifisillä antimetaboliiteilla vaatii sytotoksisen lääkkeen tason ylläpidon pidennetyn ajanjakson ajan. Sytarabiini on suuresti aikataulusta riippuvainen syövänvastainen lääke. Koska tämä lääke tappaa soluja vain silloin, kun ne tekevät DNA:ta, optimaaliselle solutapolle tarvitaan pidennetty altistus lääkkeen terapeuttisella konsentraatiolla. Valitettavasti sytarabiinin puoliintumisaika suonensisäisen (IV) tai ihonalaisen (SC) annostuksen jälkeen on erittäin lyhyt. Jotta saavutettaisiin optimaalinen syöpäsolutappo solusyklivaihespesifisellä lääkkeellä, kuten sytarabiinilla, täytyy ratkaista kaksi vaatimusta: ensiksi syöpä täytyy altistaa korkealle lääkekonsentraatiolle aiheuttamatta palautumatonta vahinkoa isännälle ja toiseksi kasvain täytyy altistaa pidennetyn ajanjakson ajan niin, että kaikki tai suurin osa syöpäsoluista on yrittänyt valmistaa DNA:n sytarabiinin läsnäollessa.

Esillä olevaa keksintöä aiemmin ainoa tapa saada aikaan jatkuvia plasmakosoluja oli jatkuva IV- tai SC-infusio, jotka molemmat ovat epämieluisia ja kalliita tapoja. Näin ollen tarvitaan näiden lääkkeiden hyväksyttävä, hidasvapautteinen depotvalmiste. Aiemmin tutkijat ovat yrittäneet saavuttaa tämän modifioimalla lääkemolekyyliä kemiallisesti metaboliin hidastamiseksi tai sitomalla hydrofobinen osa kovalenttisesti liukenemisen hidastamiseksi. Tällaiset käsittelyt ovat johtaneet uusien myrkyllisten vaikutusten syntyyn, Finkelstein et al., Cancer Treat. Rep. 63, 1331 - 1333, 1979, tai ei-hyväksyttäviin farmakokineettisiin tai formulaatio-ongelmiin, Ho et al., Cancer Res. 37, 1640 - 1643, 1977.

Näin ollen tarvitaan hidasvapautteinen depotvalmiste, joka sallii pidennetyn ja jatkuvan altistuksen biologisesti aktiivisen aineen terapeuttisella konsentraatiolla.

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää biologisesti aktiivisten multivesikulaaristen lipidivesikkulien tai

liposomien valmistamiseksi, jolloin menetelmälle on tunnusomaista, että se sisältää seuraavat vaiheet:

5 a) liuotetaan lipidikomponentti yhteen tai useampaan orgaaniseen liuottimeen, jolloin lipidikomponentti sisältää ainakin yhtä neutraalia lipidiä ja ainakin yhtä amfipaattista lipidiä, jolla on vähintään yksi negatiivinen nettovaraus;

10 b) lisätään lipidikomponenttiin sekoittumaton, ensimmäinen, hydrokloridia ja yhtä tai useampaa biologisesti aktiivista kapseloitavaa ainetta sisältävä vesikomponentti;

c) muodostetaan vesi-öljy-emulsio kahdesta sekoittumattomasta komponentista;

15 d) siirretään ja upotetaan vesi-öljy-emulsio toiseen sekoittumattomaan vesikomponenttiin;

e) dispergoidaan vesi-öljy-emulsio useita pisaroita ensimmäistä vesikomponenttia sisältävien liuotinpallosten muodostamiseksi; ja

20 f) haihdutetaan orgaaniset liuottimet liuotinpallosta multivesikulaaristen liposomien muodostamiseksi.

Näin valmistettu liposomi sallii pidennetyn ja jatkuvan altistuksen biologisesti aktiivisen aineen terapeuttisella konsentraatiolla optimaalisten tulosten aikaansaamiseksi.

25 Multivesikulaarisilla liposomeilla on korkea kapselointitehokkuus, alhainen kapseloidun aineen vuotonopeus, hyvin määritelty, toistettava koon hajonta, pallomainen muoto, säädeltävä keskikoko, jota voi helposti suurentaa tai pienentää, säädeltävä sisäkammion koko ja määrä.

30 Hydrokloridien, kuten suolahapon, käyttö on välttämätöntä korkealle kapselointitehokkuudelle ja hitaalle kapseloitujen molekyylien vuotonopeudelle biologisissa nesteissä ja in vivo. Kun hydrokloridi on hapanta, on myös välttämätöntä käyttää alhaisen ionivahvuuden omaavaa neutraloivaa ainetta estämään liuotinpallosten tarttuminen toisiinsa.

35

Niin ollen esillä olevan keksinnön päämääränä on saada aikaan hidasvapautteinen depotvalmiste, joka sallii pidennetyn ja jatkuvan altistuksen biologisesti aktiivisen aineen terapeuttisella konsentraatiolla ja on multivesikulaarinen liposomi, johon on kapseloitu biologisesti aktiivinen aine ja jolla on pidennetty ja jatkuva altistus terapeuttisella konsentraatiolla.

Keksinnön muut ja lisäpäämäärät, ominaisuudet ja edut kuuluvat siihen luonnostaan ja käyvät ilmi koko selitysosasta ja patenttivaatimuksista.

Määritelmä "multivesikulaariset liposomit" käytettynä kaikkialla selitysosassa ja patenttivaatimuksissa tarkoittaa ihmisen tekemiä, mikroskooppisia, kaksikerroksisista lipidikalvoista muodostuneita lipidivesikkeleitä, jotka sulkevat sisäänsä useita ei-samakeskisiä vesikammioita. Sitävastoin unilamellaarisissa liposomeissa on yksi vesikammio ja multilamellaarisissa liposomeissa on useita "sipulinkuori"-tyyppisiä samakeskisiä kalvoja, joiden välissä on simpukankuorimaisia samakeskisiä vesiosastoja.

Määritelmä "liuotinpallonen" käytettynä kaikkialla selitysosassa ja patenttivaatimuksissa tarkoittaa mikroskooppisia, orgaanisen liuottimen pallonmuotoisia pisaroita, joiden sisällä on useita pienempiä vesiliuoksen muodostamia pisaroita. Liuotinpalloset lietetään ja upotetaan kokonaan toiseen vesiliuokseen.

Määritelmä "neutraali lipidi" tarkoittaa öljyä tai rasvoja, joilla ei ole itsessään kykyä muodostaa kalvoja ja joilta puuttuu hydrofiilinen "pää"-ryhmä.

Määritelmä "amfipaattiset lipidit" tarkoittaa niitä molekyylejä, joilla on hydrofiilinen "pää"-ryhmä ja hydrofobinen "häntä"-ryhmä ja joilla on kyky muodostaa kalvoja.

Määritelmä "ioninvahvuus" määritellään seuraavasti:
Ioninvahvuus = $1/2 (M_1Z_1^2 + \dots)$, jossa $M_1M_2M_3 \dots$ edusta-

vat liuoksen eri ionien molaarisia konsentraatioita ja $Z_1Z_2Z_3 \dots$ ovat niiden vastaavat varaukset.

5 Määritelmä "matala ionivahvuus" on ionivahvuus, joka on vähemmän kuin noin 0,05 ja edullisesti vähemmän kuin 0,01.

10 Lyhyesti kuvattuna "vesi-lipidi"-emulsio valmistetaan ensiksi liuottamalla amfipaattiset lipidit haihtuvas-
sa orgaanisessa liuottimessa lipidikomponentiksi, lisää-
mällä lipidikomponenttiin sekoittumaton ensimmäinen vesi-
komponentti, kapseloitava aine ja hydrokloridi ja sitten
emulgoimalla tämä seos mekaanisesti. Orgaaniseen liuotti-
meen lietetyt vesipisarat muodostavat emulsiossa sisäisiä
vesikammioita ja vesikammioita rajaava amfipaattisten li-
pidien muodostama yksittäiskerros tulee lopputuotteen kak-
15 sikerroksisen kalvon yhdeksi lehdykäksi. Koko emulsio upo-
tetaan sitten yhtä tai useampaa ionitonta osmoottista ai-
netta ja matalan ionivahvuuden omaavaa happoa neutraloivaa
ainetta sisältävään toiseen vesikomponenttiin, ja sitten
sekoitetaan joko mekaanisesti, ultrasonikaatio-energialla,
20 suuttimen avulla tai niiden yhdistelmillä, jolloin muodos-
tuu toiseen vesikomponenttiin lietettyjä liuotinpalloja.
Liuotinpalloset sisältävät useita vesipisaroita, joihin
kapseloitava aine on liuennut. Haihtuva orgaaninen liuotin
haihdutetaan pallosta johtamalla kaasuvirta suspension
25 yli. Kun liuotin on kokonaan haihtunut, palloset muuttuvat
multivesikulaarisiksi liposomeiksi. Käytettäväksi sopivia,
edustavia kaasuja ovat typpi, helium, argon, happi, vety
ja hiilidioksidi.

30 Hydrokloridin käyttö on välttämätöntä korkealle
kapselointitehokkuudelle ja hitaalle kapseloitujen mole-
kyylien vuotonopeudelle biologisissa nesteissä ja in vivo.
Kun hydrokloridi on hapan, on myös välttämätöntä käyttää
matalan ionivahvuuden omaavaa neutraloivaa ainetta estä-
mään liuotinpallosten tarttuminen toisiinsa. Suolahappoa
35 suositellaan, mutta muita tyydyttäviä hydroklorideja

ovat lyysiinihydrokloridi, histidiinihydrokloridi ja niiden yhdistelmät. Sekä käytetyn hydrokloridin että neutraloivan aineen määrät voivat vaihdella pitoisuuksissa välillä noin 0,1 mM - 0,5 M ja mieluummin pitoisuuksissa
5 välillä noin 10 - 200 mM.

Monla erilaisia haihtuvia hydrofobisia liuotintyypppejä, kuten eettereit, hiilivetyjä, halogenoituja hiilivetyjä tai freoneja voidaan käyttää lipidivaiheen liuottimena. Esimerkiksi dietyylieetteri, isopropyyli ja
10 muut eetterit, kloroformi, tetrahydrofuraani, halogenoidut eetterit, esterit ja niiden yhdistelmät ovat tyydyttäviä.

Jotta estettäisiin liuotinpallosten tarttuminen toisiinsa ja astian seinään, ainakin 1 % molaarinen määrä negatiivisen nettovarauksen omaavaa amfipaattista lipidiä täytyy sisältyä pallosiin, liettävällä vesiliuoksella tulee olla hyvin matala ionivahvuus ja kun hydrokloridi on hapan, matalan ionivahvuuden omaavaa neutraloivaa ainetta tarvitaan absorboimaan hydrokloridi; muutoin liuotinpalloset sulautuvat yhteen muodostaen sotkuisen kuonan. Yhtä tai useampaa ionitonta osmoottista ainetta tarvitaan lietettävässä vesiliuoksessa pitämään osmoottinen paine tasapainossa liposomien sisä- ja ulkopuolella. Multivesikulaaristen liposomien valmistuksessa
25 voidaan käyttää erityyppisiä lipidejä, ja ainoat kaksi vaatimusta ovat, että mukana on yksi neutraali lipidi ja yksi amfipaattinen lipidi, jolla on negatiivinen nettovaraus. Esimerkkejä neutraaleista lipideistä ovat trioleiini, trioktanioni, kasvisöljy, kuten soi-japapuuöljy, ihra, naudanrasva, tokoferoli ja niiden yhdistelmät. Esimerkkejä
30 negatiivisen nettovarauksen omaavista amfipaattisista lipideistä ovat kardioliipiini, fosfatidyyliiseriinit, fosfatidyyliglyserolit ja fosfatidihapot.

Toinen vesikomponentti on vesiliuos, joka sisältää
35 liuenneita aineita, kuten hiilihydraatteja, mukaan lukien

glukoosi, sakkaroosi ja laktoosi, ja aminohappoja, kuten lyysiini, vapaan emäksen omaava histidiini ja niiden yhdistelmät.

5 Multivesikulaarisiin liposomeihin voidaan sisällyttää kapseloimalla monia ja vaihtelevia biologisia aineita. Nämä sisältävät lääkkeitä ja muunlaisia materiaaleja, kuten DNA:ta, RNA:ta, erityyppisiä proteiineja, yhdistelmä-DNA-teknologialla tuotettuja, ihmisille tehokkaita proteiinihormoneja, hematopoieettisia kasvutekijöitä, monokiinejä, lymfokiinejä, kasvaimen nekroositekijää, inhibiiniä, kasvaimen kasvutekijää alfa ja beeta, Mullerian'in inhibiittoriainetta, hermojen kasvutekijää, fibroblastien kasvutekijää, verihiutaleista peräisin olevaa kasvutekijää, aivolisäkkeen ja hypofyyysin hormoneja, mukaan lukien
10 LH ja muut vapauttajahormonit, kalsitoniiniä, rokotuksessa immunogeeneinä palvelevia proteiineja ja DNA- sekä RNA-sekvenssejä.

Seuraava taulukko 1 sisältää listan edustavista, biologisesti aktiivisista aineista, jotka voidaan kapseloida multivesikulaarisiin liposomeihin hydrokloridin läsnäollessa ja jotka ovat tehokkaita ihmisille.
20

Taulukko 1

Astman vastaiset	Sydämen rytmihäiriön vastaiset	Rauhoittavat lääkkeet
metaproterenoli	propanololi	klorpromatsiini
aminofylliini	atenololi	bentsodiatsepiini
teofylliini	verapamiili	butyrofenonit
terbutaliini	kaptopriili	hydroksitsiini
tegretoli	isosorbidi	meprobamaatti
efedriini		fenotiatsiini
isoproterenoli		reserpiini
adrenaliini		tioksantiini
norepinefriini		
Sydänglykosidit	Hormonit	Steroidit
digitalis	antidiureetti	prednisoni
digitoksiini	kortikosteroidit	triamkinoloni
lanatosidi C	testosteroni	hydrokortisoni
digoksiini	estrogeeni	deksametasoni
	kilpirauhashormoni	beetametasoni
	kasvuhormoni	prednisoloni
	ACTH	
	progesteroni	
	gonadotropiini	
	mineraalikortikoidi	

Taulukko 1 (jatkoa)

Sydänglykosidit	Hormonit	Steroidit
	LH	
	LHRH	
	FSH	
	kalsitoniini	
Korkean verenpaineen vastaiset	Sokeritaudin vastaiset	Antihistamiinit
apresoliini	Diabene	pyribentsamiini
atenololi	insuliini	klorfeniramiini
		difenhydramiini
Loisten vastaiset	Syövän vastaiset	Rauhoittavat & puuduttavat lääkkeet
prasikvanteli	atsatiopriini	morfiini
metronidatsoli	bleomysiini	dilauidi
pentamidiini	syklofosfamidi	kodeiini
	adriamysiini	kodeiinin kaltaiset
	daunorubisiini	synteettiset aineet
	vinkristiini	demeroli
	metotreksaatti	oksimorfoni
	6-TG	fenobarbitaali
	6-MP	barbituraatit

:

Taulukko 1 (jatkoa)

Loisten vastaiset	Syövän vastaiset	Rauhoittavat & puuduttavat lääkkeet
	vinblastiini	
	VP-16	
	VM-26	
	kisplatiini	
	FU	
Antibiootit	Immunoterapeutit	Rokotteet
penisilliini	interferoni	influenta
tetrasykliini	interleukiini-2	"respiratory syncytial"-virus
erytromysiini	monoklonaaliset	Hemophilus influenza
	vasta-aineet	rokote
kefalotiini	gammaglobuliini	
imipeneemi	<u>Sienten vastaiset</u>	<u>Virusten vastaiset</u>
kefotaksiimi	amfoterisiini B	asykloviiri ja johdannaiset
karbenisilliini	mykonatsoli	Winthrop-51711
vankomysiini	muramyylidipeptidi	ribaviriini
gentamysiini		
tobramysiini		

95439

Taulukko 1 (jatkoa)

Antibiootit	Sienten vastaiset	Virusten vastaiset
piperasilliini	klortimatsoli	rimantadiini/amantadiini
moksalaktaami	Matalan verenpaineen vastaiset	atsidotymidiini & johdannaiset
amoksisilliini		
ampisilliini		adeniinarabinosidi
kefatsoliini	dopamiini	amidiinityyppiset
		proteaasi-inhibiittorit
kefadroksiili	dekstroamfetamiini	
kefoksitiini		<u>Muut</u>
muut aminoglykosidit		solupinnan reseptori-blokkaajat
Proteiinit ja glykoproteiinit		
lymfokiinit		<u>Nukleiinihapot & analogit</u>
interleukiinit		
1,2,3,4,5 ja 6		
sytokiinit		
GM-CSF		DNA
M-CSF		RNA
G-CSF		metyylifosfonaatit ja analogit
kasvaimen nekroositekijä		
inhibiini		
kasvaimen kasvutekijä		

Taulukko 1 (jatkoa)Antibiootit

Mullerian'in inhibiittoriaine

hermon kasvutekijä

5 fibroblastin kasvutekijä

verihituleista peräisin oleva kasvutekijä

veren hyytymistekijät (esim. VIII, IX, VII)

insuliini

kudoksen plasminogeeniaktivaattori

10 histokompatibiliteettiantigeeni

onkogeenuotteet

myeliinin emäksinen proteiini

kollageeni

fibronektiini

15 laminiini

muut yhdistelmä-DNA-teknologialla valmistetut proteiinit

Ihmisille käytettäväksi sopiva annosmäärä sisältää välin 1 - 6000 mg/m² kehon pinta-alaa. Syy, että vaihteluväli on niin laaja, on se, että joissakin sovellutuksissa, kuten ihonalaisessa annostelussa, tarvittava annosmäärä saattaa olla melko pieni, mutta muissa sovellutuksissa, kuten vatsaonteloon annosteltaessa, käytettäväksi haluttu annosmäärä voi olla kerrassaan valtava. Koska edellä mainittujen annosrajojen ulkopuolella olevia määriä voidaan antaa, tämä vaihteluväli ympäröi käytännöllisesti kaikkien biologisesti aktiivisten aineiden käyttöaluetta.

Multivesikulaarisia liposomeja voidaan antaa mil-lä tahansa toivotulla tavalla; esimerkiksi selkäydinkanavaan, vatsaonteloon, ihonsisäisesti, laskimonsisäisesti, 30 imunesteeseen, suun kautta ja limakalvon sisäisesti monien erilaisten epiteelien alle sisältäen keuhkoputkien epiteelit, ruuansulatuskanavan epiteelit, virtsaputken epiteelit ja monet kehon limakalvot, sekä lihaksensisäisesti.

Seuraavat esimerkit kuvaavat tällä hetkellä suosittelavat menetelmät näiden biologisesti aktiivisia ainei-

35

ta sisältävien multivesikulaaristen liposomien valmistamiseksi.

Esimerkki 1

Vaihe 1

5 Puhtaaseen yhden dramman lasipulloon (ulkoiset mitat halkaisija 1,4 cm x korkeus 4,5 cm) laitettiin 9,3 μ mol dioleoyylilesitiiniä, 2,1 μ mol dipalmitoyylifosfatidyylyglyserolia, 15 μ mol kolesterolia, 1,8 μ mol trio-

10 Vaihe 2

Yksi ml vesifaasia, sytosiiniarabinosidia (20 mg/ml) liuotettuna 0,136 N suolahappoon, lisättiin yllä mainittuun, lipidifaasia sisältävään yhden dramman pulloon.

15 Vaihe 3

Vesi-öljy-emulsion valmistamiseksi pullo suljettiin ja kiinnitettiin vortex-sekoittajan päähän ja sekoitettiin suurimmalla nopeudella 6 minuuttia.

Vaihe 4

20 Veteen lietettyjen kloroformipallosien valmistamiseksi puolet emulsiosta ruiskutettiin sitten jokainen nopeasti ohuen Pasteur-pipetin kärjen läpi yhden dramman pulloihin, joista jokainen sisälsi 4-prosenttista dekstroosia vedessä ja 40 mM lyysiiniä, vapaata emästä, ja ravisteltiin sitten vortex-sekoittajalla puolella nopeudella

25 3 sekuntia kloroformipallosten muodostamiseksi.

Vaihe 5

Kahden pullon kloroformipallosten suspensiot kaadettiin 5 ml vettä, glukoosia (3,5 g/100 ml) ja vapaan emäksen omaavaa lyysiiniä (40 mM) sisältävän 250 ml:n

30 Erlenmeyer-pullon pohjalle, ja typpikaasuvirran annettiin virrata pullon läpi nopeudella 7 l/min 10 - 15 minuutin ajan 37 °C:ssa kloroformin haihduttamiseksi hitaasti. Liposomit eristettiin sitten sentrifugoimalla 600 x g 5

35 minuuttia.

Tuloksena syntyneiden liposomien keskimääräinen tilavuuden mukaan tarkistettu koko ($\pm$ jakautumisen standardihajonta) oli $19,4 \pm 6,5 \mu\text{m}$. Saalispitoisuus oli 59 ± 7 prosenttia ja saalistilavuus oli $36 \pm 4 \mu\text{l/mg}$ käytettyä kokonaislipidiä. Hydrokloridin lisäyksellä oli merkittävä vaikutus sytosiiniarabinosidin vuotonopeuteen ihmisen plasmassa inkuboiduista multivesikulaarisista liposomeista. Puolet lääkkeestä vuoti ulos 12 vuorokaudessa, kun suolahappoa lisättiin yllä esitetyssä esimerkissä, kun taas puolet lääkkeestä vuoti ulos vain 12 tunnissa, kun suolahappo jätettiin pois yllä esitetyssä vaiheessa 2. Kun testattiin eläimillä, hydrokloridin lisäyksellä oli taas merkittävä vaikutus sytosiiniarabinosidin vapautumisnopeuteen; lääke pysyi hiiren vatsaontelossa paljon kauemmin, kun suolahappoa lisättiin valmistuksen aikana.

Seuraava esimerkki kuvaa laajennetun menetelmämitakaavan suurien multivesikulaaristen liposomimäärien valmistamiseksi.

Esimerkki 2

20 Vaihe 1

Ruostumattomasta teräksestä valmistettuun homogenisattoriin (Omni-Mixer 17150, Sorval Co., Newton, CT) laitettiin $186 \mu\text{mol}$ dioleoyylilesitiiniä, $42 \mu\text{mol}$ dipalmitoyylifosfatidyylyglyserolia, $300 \mu\text{mol}$ kolesterolia, $36 \mu\text{mol}$ trioleiinia ja 20 ml kloroformia (lipidifaasi).

Vaihe 2

20 ml vesifaasia, sytosiiniarabinosidia (20 mg/ml) liuotettuna $0,136 \text{ N}$ suolahappoon, lisättiin yllä olevaan, lipidifaasia sisältävään, ruostumattomasta teräksestä valmistettuun sekoittajaan sen pyöriessä.

Vaihe 3

Vesi-öljy-emulsion valmistamiseksi homogenisattori suljettiin ja ajettiin asetuksella "7" 3 minuuttia.

Vaihe 4

35 Veteen lietettyjen kloroformipallosten valmistamiseksi emulsio kaadettiin sitten (pyörityksen ollessa käyn-

nissä) puoliksi kahteen muuhun, ruostumattomasta teräksestä valmistettuun homogeenointiastiaan, joista kumpikin sisälsi 200 ml 4-prosenttista dekstroosia vedessä ja 40 mM lyysiiniä vapaana emäksenä, ja sitten homogenisoitiin Omni-Mixer'llä 3 sekuntia asetuksella "1".

Vaihe 5

Kummankin homogeenointiastian kloroformipallosten suspensiot kaadettiin tasapohjaiseen, suorakulmaiseen teräsastiaan, jonka pohjan mitat olivat 20,32 x 30,48 cm (8 x 12 tuumaa), ja tyypikaasu- tai ilmavirran annettiin virrata astian läpi nopeudella 14 l/minuutti 10 - 15 minuutin ajan kloroformin hitaaksi haihduttamiseksi. Liposomit eristettiin sitten sentrifugaatiolla 600 x g 5 minuuttia.

Seuraava esimerkki kuvaa pienempien ja suurempien liposomien valmistusmenetelmiä.

Esimerkki 3

Esimerkeissä 1 tai 2 esitettyjä liposomeja pienempien liposomien valmistamiseksi kohotettiin esimerkkien 1 tai 2 vaiheen 4 ravistelun tai homogeenoinnin mekaanista voimakkuutta tai kestoaikaa. Suurempien liposomien valmistamiseksi alennettiin esimerkkien 1 tai 2 vaiheen 4 ravistelun tai homogeenoinnin mekaanista voimakkuutta tai kesto-

aikaa. Seuraava esimerkki 4 kuvaa edustavia menetelmiä erilaisia lipidikoostumusten omaavien liposomien valmistamiseksi ja erilaisten materiaalien sisällyttämistä liposomeihin.

Esimerkki 4

Esimerkkien 1 tai 2 vaiheessa 1 voidaan käyttää muita amfipaattisia lipidejä, kuten fosfatidyylikoliineja (PC), karbiolipiiniä (CL), dimyristoyylifosfatidyylylglyserolia (DMPG), fosfatidyylietanolamiineja (PE), fosfatidyyliiseriinejä (PS) ja dimyristoyylifosfatidihappoa (DMPA), eri yhdistelminä samanlaisilla tuloksilla. Esimerkiksi yhdistelmiä PC/C/CL/TO molaarisella suhteella 4,5/4,5/1/1;

DOPC/C/PS/TO molaarisella suhteella 4,5/4,5/1/1;

PC/C/DPPG/TC molaarisella suhteella 5/4/1/1;

PC/C/PG/TC molaarisella suhteella 5/4/1/1; PE/C/CL/TO molaarisella suhteella 4,5/4,5/1/1; ja PC/C/DMPA/TO molaarisella suhteella 4,5/4,5/1/1 voidaan kaikkia käyttää.

5 Muiden biogeneettisesti aktiivisten materiaalien sisällyttämiseksi sytosilniarabinosidi yksinkertaisesti korvataan halutulla materiaalilla tai taulukon 1 materiaalien yhdistelmällä esimerkkien 1 tai 2 vaiheessa 2. Kaikki nämä muodostavat multivesikulaaarisia liposomeja, jotka ovat tehokkaita ihmisillä ja sallivat pidennetyn altistuksen biologisesti aktiivisen aineen terapeuttisella konsentraatiolla.

15 Näin ollen esillä oleva keksintö esittää laajaso-
vellutuksiset ja -käyttöiset depotvalmisteet, joihin biologisesti aktiiviset aineet on kapseloitu suhteellisen suurina määrinä ja jotka sallivat pidennetyn altistuksen näiden aineiden terapeuttisilla konsentraatioilla optimaalisten tulosten aikaansaamiseksi välttämättä korkeita annos-
20 huippuja, jotka voivat olla myrkyllisiä.

Esillä oleva keksintö sopii näin ollen hyvin ja on adaptoitu saavuttamaan tarkoitukset ja päämäärät ja mainitut edut ja ominaisuudet kuin myös muut seikat kuuluvat siihen luonnostaan.

25 Samalla kun keksinnön nykyään suositeltavat suoritustavat on annettu julkistamisen vuoksi, niihin voidaan tehdä keksinnön henkeen kuuluvia muutoksia, kuten patenttivaatimusten puitteissa on määritelty.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä biologisesti aktiivisten multivesikulaaristen lipidivesikkeliä tai liposomien valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää seuraavat vaiheet:

a) liuotetaan lipidikomponentti yhteen tai useampaan orgaaniseen liuottimeen, jolloin lipidikomponentti sisältää ainakin yhtä neutraalia lipidiä ja ainakin yhtä amfipaattista lipidiä, jolla on vähintään yksi negatiivinen nettovaraus;

b) lisätään lipidikomponenttiin sekoittumaton, ensimmäinen, hydrokloridia ja yhtä tai useampaa biologisesti aktiivista kapseloitavaa ainetta sisältävä vesikomponentti;

c) muodostetaan vesi-öljy-emulsio kahdesta sekoittumattomasta komponentista;

d) siirretään ja upotetaan vesi-öljy-emulsio toiseen sekoittumattomaan vesikomponenttiin;

e) dispergoidaan vesi-öljy-emulsio useita pisaroita ensimmäistä vesikomponenttia sisältävien liuotinpallosten muodostamiseksi; ja

f) haihdutetaan orgaaniset liuottimet liuotinpalloista multivesikulaaristen liposomien muodostamiseksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lipidikomponentti on fosfolipidi tai fosfolipidiseos.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fosfolipidi on fosfatidyylikoliini, kardioliini, fosfatidyylietanoliini, sfingomyeliini, lysofosfatidyylikoliini, fosfatidyyliiseriini, fosfatidyyli-inositoli, fosfatidyyliglyseroli tai fosfatidihappo.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ainakin yksi fosfolipideistä

on ryhmä, jolla on vähintään yksi negatiivinen nettovaraus.

5 5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että fosfolipidiä käytetään seok-
sena kolesterolin kanssa.

 6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että fosfolipidiä käytetään seok-
sena stearyyliamiinin kanssa.

10 7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että lipofiilistä, biologisesti
aktiivista materiaalia käytetään seoksena lipidikomponen-
tin kanssa.

 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että neutraali lipidi on tri-
oleiini, trioktanoiini, kasvisöljy, ihra, naudan rasva,
15 tokoferoli tai niiden yhdistelmä.

 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että orgaaninen liuotin on die-
tyyllieetteri, isopropyylieetteri, kloroformi, tetrahydro-
20 furaani, eetteri, hiilivety, halogenoitu hiilivety, este-
ri tai niiden yhdistelmä.

 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että hydrokloridi on suolahappo,
lysiinihydrokloridi, histidiinihydrokloridi tai niiden
25 yhdistelmä.

 11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kapseloitava aine on hydro-
fiilistä biologisesti aktiivista materiaalia.

30 12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kahden komponentin emulgoin-
ti suoritetaan käyttäen menetelmää, joka on mekaaninen ra-
vistelu, ultrasonikaatioenergia tai suuttimen avulla ha-
jottaminen.

 13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
35 t u n n e t t u siitä, että hydrokloridi on hapan ja toi-

nen vesikomponentti sisältää ainakin yhden neutraloivan aineen.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että neutraloiva aine on vapaan
5 emäksen muodossa oleva lyysiini, vapaan emäksen muodossa oleva histidiini tai niiden yhdistelmä.

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että toisella vesikomponentilla on matala ionivahvuus.

10 16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että toinen vesikomponentti on vesiliuos, joka sisältää liuenneita aineita, joita ovat hiilihydraatit tai aminohapot.

15 17. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että toinen vesikomponentti on vesiliuos, joka sisältää liuenneita aineita, joita ovat glukosi, sakkaroosi, laktoosi, vapaan emäksen muodossa oleva lyysiini, vapaan emäksen muodossa oleva histidiini tai niiden yhdistelmä.

20 18. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että liuotinpallosten muodostaminen suoritetaan käyttäen menetelmää, joka on mekaaninen ravistelu, ultrasonikaatioenergia, suuttimen avulla hajottaminen tai niiden yhdistelmä.

25 19. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että orgaanisen liuottimen haihdutus tapahtuu kaasuvirtauksella toisten vesikomponenttien yli.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av biologiskt aktiva multivesikulära lipidvesiklar eller liposomer,
5 k ä n n e t e c k n a t av att det omfattar förjande steg:

a) en lipidkomponent upplöses i ett eller flera organiska lösningsmedel, varvid lipidkomponenten innehåller
10 åtminstone en neutral lipid och åtminstone en amfipatisk lipid med åtminstone en negativ nettoladdning;

b) en i lipidkomponenten oblandad, första vattenkomponent som innehåller ett eller flera biologiskt aktiva inkapslade ämnen tillsätts;

c) en vatten-olje-emulsion bildas av de två oblandade komponenterna;
15

d) vatten-olje-emulsionen överförs och nedsänks i en andra oblandad vattenkomponent;

e) vatten-olje-emulsionen dispergeras för att bilda små bollar av lösningsmedel som innehåller flera
20 droppar av den första vattenkomponenten; och

f) de organiska lösningsmedlen avdunstas från de små bollarna av lösningsmedel för att bilda multivesikulära liposomer.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
25 t e c k n a t av att lipidkomponenten är en fosfolipid eller en fosfolipidblandning.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e -
t e c k n a t av att fosfolipiden är fosfatidylkolin, kardiolipin, fosfatidyletanolamin, sfingomyelin, lyso-
30 fosfatidylkolin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol, fosfatidylglyserol eller fosfatidsyra.

4. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e -
t e c k n a t av att åtminstone en av fosfolipiderna utgör en grupp med åtminstone en negativ nettoladdning.

5. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e -
t e c k n a t av att fosfolipiden används som en bland-
ning med kolesterol.

5 6. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e -
t e c k n a t av att fosfolipiden används som en bland-
ning med stearylamin.

7. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att lipofilt, biologiskt aktivt mate-
rial används som en blandning med lipidkomponenten.

10 8. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att den neutrala lipiden är triolein,
trioktanoin, en växtolja, ister, nötfett, tokoferol eller
en blandning därav.

15 9. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att det organiska lösningsmedlet är die-
tyleter, isopropyleter, kloroform, tetrahydrofuran, eter,
kolväte, halogenerad kolväte, ester eller en blandning
därav.

20 10. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att hydrokloriden är saltsyra, lysin-
hydroklorid, histidinhydroklorid eller en blandning därav.

25 11. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att det inkapslade ämnet är hydrofilt,
biologiskt aktivt material.

30 12. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att emulgeringen av de två komponenter-
na utförs medelst ett förfarande som är mekanisk skak-
ning, ultrasonikationsenergi eller finfördelning med hjälp
av en dysa.

13. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att hydrokloriden är sur och den andra
vattenkomponenten innehåller åtminstone ett neutralise-
rande ämne.

35 14. Förfarande enligt patentkrav 13, k ä n n e -
t e c k n a t av att det neutraliserande ämnet är lysin

i form av en fri bas, histidin i form av en fri bas eller en blandning därav.

5 15. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att den andra vattenkomponenten har låg
ionstyrka.

16. Förfarande enligt patentkrav 15, k ä n n e -
t e c k n a t av att den andra vattenkomponenten är en
vattenlösning som innehåller upplösta ämnen, vilka är
kolhydrater eller aminosyror.

10 17. Förfarande enligt patentkrav 15, k ä n n e -
t e c k n a t av att den andra vattenkomponenten är en
vattenlösning som innehåller upplösta ämnen, vilka är glu-
kos, sackaros, laktos, lysin i form av en fri bas, histi-
din i form av en fri bas eller en blandning därav.

15 18. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att bildandet av de små bollarna av lös-
ningmedel utförs genom ett förfarande som är mekanisk
skakning, ultrasonikationsenergi, finfördelning med hjälp
av en dysa eller en blandning därav.

20 19. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att andunstingen av det organiska lös-
ningsmedlet sker genom att gas passeras över de andra vat-
tenkomponenterna.