(19) DANMARK

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 163277 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5730/82
(22) Indleveringsdag: 23 dec 1982
(24) Løbedag: 14 apr 1982
(41) Alm. tilgængelig: 23 dec 1982
(44) Fremlagt: 17 feb 1992
(86) International ansøgning nr.: PCT/US82/00464
(86) International indleveringsdag: 14 apr 1982
(85) Videreførelsesdag: 23 dec 1982
(30) Prioritet: 27 apr 1981 US 258016

(51) Int.Cl.5 A 61 K 9/127
A 61 K 31/71
//(A 61 K 31/71,
A 61 K 47:24)

(71) Ansøger: *GEORGETOWN UNIVERSITY; Thirty-seventh and O Street; N.W.; Washington D.C. 20057, US

(72) Opfinder: Aquilur *Rahman; US, Philip S. *Schein; US

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Anthracyklinglycosid-kardiolipinkompleks indkapslet i liposomer, fremgangsmåde til fremstilling heraf samt terapeutisk præparat indeholdende dette

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 3993754
Andre publikationer: CA, vol 92, nr. 193112 u
CA, vol 91, nr. 168666 z
CA, vol 92, nr. 33853 h

(57) Sammendrag

5730-82

Anthracyklinglycosid-antibiotika bindes kompleks med kardiolipin og derpå indkapslet i liposomer for at reducere pattedyrshjerte-vævsoptagelse af anthracyklinglycosidet og derved at reducere den skadelige virkning af sådan kardialvævsoptagelse. Opfindelsen er rettet mod præparatet, fremstilling og anvendelse af det indkapslede kompleks af anthracyklinglycosid.

DK 163277 B

Den foreliggende opfindelse angår et anthracyklinglycosid-kardiolipinkompleks indkapslet i liposomer, en fremgangsmåde til fremstilling heraf, samt et terapeutisk præparat indeholdende dette.

Anthracyklinglycosider er antibiotika, hvori en tetrahydronaphthacen-chromophor er bundet til en sukkerart, mest almindeligt en basisk sukkerart. Repræsentative anthracyklinglycosid-antibiotika omfatter

doxorubicin
daunorubicin
daunorubicinol
doxorubicinol

og farmaceutisk acceptable analoge, derivater og salte deraf.

Anthracyklinglycosider, såsom doxorubicin HCl (Adriamycin, et produkt ifølge US patent nr. 3.590.028) og daunorubicin (US patent nr. 4.012.284) og farmaceutisk acceptable analoge, derivater og salte deraf, er også kendte onkolytiske midler. Repræsentative analoge er beskrevet i K. Yamamoto et al., J. Med. Chem. 15, 872 (1973); DE patent nr. 2.327.211, nr. 2.557.537 og nr. 1.920.198; E. Bachman et al., Agents and Actions 5/4, 383 (1975); P. Chandra, Cancer Chemother. Rep. 6, 115 (1975); F. Arcamone et al., id. at 123 og G. Zbinden et al., Cancer Chemother. Rep. 4, 707 (1975).

Den samlede nytte af anthracyklinglycosiderne som antibiotika og onkolytiske midler er alvorligt begrænset på grund af behandlingsbegrænsende og potentielt letal kardiotoksicitet. De kardiotoksiske virkninger af doxorubicin HCl (Adriamycin) og daunorubicin er blevet dokumenteret (US patent nr. 4.138.480). Kumulativ myokardial beskadigelse er blevet sat i forbindelse med adriamycindoser på over 500 mg/m^2 og endda ved mindre doser i patienter med tidligere medastinal bestråling og tager form af hårdnakket kongestiv hjertefejl. Elektronmikroskopiske

undersøgelser af hjertevævet i sådanne tilfælde har påvist en slående degenerering af myofibriller og mitokondrial distorsion såvel som en reduktion i kardial-myocyter, Lefrak, E.A., Pitha, J., Rosenheim, S., O'Bryan, R.M., Burgess, M.A., Gottlieb, J.A.: Adriamycin (NSC-123127) Cardiomyopathy. Cancer Chemother. Rep. 6:203-208 (1975). Farmakokinetiske undersøgelser har vist, at adriamycin (doxorubicin HCl) optages begærligt og fortrinsvis af hjertemusklen, Yesair, D.W., Schwartzbach, E., Shuck, D., Denine, E.P., Asbell, M.A.: Comparative pharmacokinetics of Daunomycin and Adriamycin in several animal species. Cancer Research, 32:1177-1183 (1972). Det er kendt, at administration af adriamycin (doxorubicin HCl) bevirker forekomsten af kardial toksicitet selv ved doser under anbefalet kumulativ grænse, og det anbefales derfor ikke at starte doxorubicin HCl-terapi ved sådanne doser. At starte behandling er også kontraindiceret i tilfælde, hvor der har været forudgående behandling med fuldstændigt kumulative doser af adriamycin og/eller daunorubicin.

Fra Chemical Abstracts, bind 91, 1979, side 72, nr. 168666z og Chemical Abstracts, bind 92, 1980, side 227, nr. 193122u er det kendt, at henholdsvis daunorubicin og adriamycin kan danne komplekser med kardiolipin.

Fra Chemical Abstracts, bind 92, 1980, side 42, nr. 33853h er det kendt, at adriamycin kan bindes til liposomer fremstillet ud fra phosphatidylcholin alene eller ud fra en blanding af phosphatidylcholin og en mindre mængde af kardiolipin på 1-6%.

Fra US-patentskrift nr. 3.993.754 er det kendt at indkapsle actinomycin i liposomer med henblik på at mindske toksiciteten af actinomycin ved cancerterapi. I de i skriftet anførte eksempler er liposomerne fremstillet ud fra en blanding af lechitin og cholesterol. Det anføres dog i spalte 3, l. 7 - 17, at det er muligt at foretage mindre variationer af liposomblandingen, f.eks. ved tilsætning af mindre mængder af cholesterol, stearylamin eller phosphatidylserin. I skriftet næv-

nes intet steds noget specifikt vedrørende mindsket kardialvævsoptagelse.

Den foreliggende opfindelse angår et anthracyklinglycosid-kardiolipinkompleks indkapslet i liposomer og et præparat indeholdende dette, som selektivt vil reducere optagelsen af anthracyklinglycosidlægemidler, såsom doxorubicin HCl, i kardialvæv under bevarelse af lægemidlets antibiotiske og antitumor-virkning.

Opfindelsen angår et anthracyklinglycosid-kardiolipinkompleks indkapslet i liposomer og et præparat indeholdende dette til en pattedyrsvært, som udøver terapeutiske fordele, men også er karakteriseret ved fortrinsberettiget kardialvævsoptagelse (dvs. anthracyklinglycosidet optages med præference i kardialvævet) i værten med medfølgende kardiotoksicitet og kardiomyopati. Selve præparatet bevarer den terapeutiske aktivitet af anthracyklinglycosidet, medens det selektivt reducerer værtens kardialvævsoptagelse af præparatet og derved i væsentlig grad reducerer bivirkningerne af kardiotoksicitet og kardiomyopati. Præparatet omfatter et anthracyklinglycosid, kardiolipin og liposomer. Fremgangsmåderne ifølge opfindelsen omfatter fremstilling af anthracyklinglycosid-kardiolipinkomplekset indkapslet i liposomer.

Anthracyklinglycosidet i præparatet skal udøve antibiotisk og/eller onkolytisk virkning og være karakteriseret ved kardialvævoptagelse i en pattedyrsvært og ved tilstedeværende kardiotoksicitet og/eller kardiomyopati og kan være et ikketoksisk farmaceutisk acceptabelt derivat eller salt deraf. Det er veldokumenteret, at doxorubicin-HCl (adriamycin) og daunorubicin er sådanne anthracyklinglycosider. I præparatet ifølge opfindelsen er anthracyklinglycosidet doxorubicin, daunorubicin og farmaceutisk acceptable derivater eller salte deraf.

Opfindelsen angår således et anthracyklinglycosid-kardiolipinkompleks, som er ejendommeligt ved, at det er indkapslet i liposomer.

Opfindelsen angår desuden en fremgangsmåde til fremstilling af ovennævnte kompleks, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at den omfatter, at man

(a) blander anthracyklinglycosidet med en mængde af kardiolipin, som er tilstrækkeligt til at danne et kompleks med anthracyklinglycosidet, således at der dannes et anthracyklinglycosid-kardiolipinkompleks;

(b) indkapsler komplekset i liposomer ved at blandet kompleksset med en lipidholdig opløsning, som danner liposomer under denne blanding, og derpå

(c) isolerer det indkapslede kompleks.

Opfindelsen angår også et terapeutisk præparat, som er ejendommeligt ved, at det omfatter ovennævnte kompleks sammen med en farmaceutisk acceptabel bærer.

Anthracyklinglycosidet bindes komplekst med kardiolipin. I anthracyklinglycosid-kardiolipin-komplekset er kardiolipinet i det mindste fysisk bundet til anthracyklinglycosidet. Kardiolipinmængden i anthracyklinglycosidkardiolipin-komplekset kan variere fra ca. 30% til ca. 70% beregnet på anthracyklinglycosidets vægt. Anthracyklinglycosid-kardiolipin-komplekset dannes ved at blande anthracyklinglycosidet med kardiolipinet i et opløsningsmiddel i et tidsrum, som er tilstrækkeligt til at tillade kompleksdannelse, og derpå isolering af komplekset ved afdampning af opløsningsmidlet. Opløsningsmidlet kan være en hvilken som helst væske, hvori hver komponent er opløselig; ved en særlig udførelsesform for opfindelsen er et sådant opløsningsmiddel methanol. Afdampning af opløsningsmidlet sker fortrinsvis ved, at der i den komplekholdige opløsning blæses en gas, som er inaktiv overfor komplekset og dets komponenter, såsom nitrogen.

Efter dannelse af anthracyklinglycosid-kardiolipin-komplekset indkapsles komplekset i liposomer. Indkapsling sker ved at

indføre komplekset i en opløsning indeholdende lipider, som vil danne liposomer. Liposomerne er fortrinsvis positive liposomer. Positive liposomer kan dannes ud fra en opløsning indeholdende phosphatidylcholin, cholesterol og stearylamin. Negative liposomer dannes ud fra opløsninger indeholdende phosphatidylcholin, cholesterol og phosphatidylserin.

Liposomdannelse og indkapsling omfatter dispergering af komplekset af anthrascyklinglycosid og kardiolipin i nævnte lipidholdige opløsning. Dispergeringen sker almindeligvis ved at anvende en magnetomrører i ca. 20 minutter til dannelse af dispersionen og/eller lydbehandling af liposomerne. Det indkapslede produkt isoleres ved derfra at fjerne frit anthracyklinglycosid. Frit anthracyklinglycosid kan isoleres fra indkapslet produkt ved ekstensiv dialyse, f.eks. mod 0,001M phosphatpuffer med 0,85% NaCl ved en pH-værdi på 7,4 og ved 4°C i løbet af en periode på 30 timer med mindst tre skift af pufferopløsning.

Vægten af lipider, som danner liposomer, vil variere afhængigt af de nøjagtige betingelser, som blev anvendt til at danne dem, og vil således variere fra ca. to gange til ca. seks gange baseret på vægten af anthracyklinglycosid-indhold. Som det vil fremgå af det følgende, reducerer liposomindkapslet kardiolipidkompleks selektivt optagelsen af det kompleksdannede lægemiddel i kardialvævet med en ledsagende reduktion af akut kardiotoksicitet. Den behandlingsbegrænsende toksicitet af de fleste af anthracyklinglycosiderne eller analoge er den kumulative beskadigelse af kardialvæv, som giver en grænse for den samlede dosis af disse lægemidler, som kan administreres. Det viser sig, at levering af disse lægemidler i liposomindkapslet kardiolipinkompleks er af stor klinisk betydning i forbindelse med at løse dette problem.

Opfindelsen vil blive belyst og forklaret ved hjælp af særlige udførelsesformer på tegningerne og i eksemplerne, som er beskrevet nedenfor.

Fig. 1 er en grafisk afbildning (af koncentrationen af lægemiddel i hjertevæv mod tid (timer)), hvor ændringen i koncentration i kardialvæv af frit adriamycin-administration med tiden er sammenlignet med koncentrationen i kardialvæv af adriamycin-holdige præparater ifølge opfindelsen efter administration og ligeledes koncentrationen i kardialvæv af adriamycin indkapslet i liposomer uden dannelse af et kardiolipinkompleks.

Fig. 2 er et elektromikrofotografi af kardialvæv fra DBA/2 mus efter intravenøs administration af 15 mg/kg frit adriamycin, som udviser tab og fragmentation af myofilamenter med ledsagende klaring af organeller og opkvældning af sarcoplasmiske områder.

Fig. 3 er et elektromikrofotografi af kardialvæv fra en DBA/2 mus efter administration af 15 mg/kg adriamycin komplekst bundet med kardiolipin og indkapslet i liposomer ifølge opfindelsen, hvilket viser et i alt væsentligt normalt udseende myokardium med begrænset toksisk beskadigelse, manifesteret som vakuolisering, der ses i vaskulært forbundne væv mellem nabomyocytter.

Eksemlper

Eksempel 1 - Fremstilling af et anthracyklinglycosid-kardiolipin-liposompræparat ifølge opfindelsen

Til fremstilling af et adriamycin-kardiolipin-kompleks indkapslet i liposom-præparat blandes 11,6 µmol adriamycin i methanolopløsning med 5,9 µmol kardiolipin i ethanol i en kolbe. De to opløsninger inddampes derpå langsomt til tørhed under en nitrogenstrøm.

Til kolben, som indeholder den tørrede adriamycin og kardiolipinfilm, tilsættes derpå fortløbende følgende opløsning af lipider, 1) 28,5 µmol phosphatidylcholin, 2) 19,4 µmol choleste-

rol og 3) 11,5 µmol stearylamin. Kolbeindholdet omrøres jævnt og tørres under nitrogen under dannelse af en tynd film langs kolbens sider. Den tørrede film af kardiolipinkompleks og lipider blandes derpå med 6 ml 0,9% NaCl og får lov til at hydratisere i 30 minutter. Kolbens indhold omrøres derpå med en magnetomrører i 10 minutter til dannelse af multilamellare liposomer, som derpå lydbehandles i et instrument af badtypen (Heat System 100 W) i 90 minutter med en løbende temperaturkontrol (37°C). Med 10 minutters mellemrum under lydbehandlingen overstrømmes kolbens indhold med en nitrogenstrøm. Efter endt lydbehandling blev det ikke indkapslede adriamycin skilt fra det liposomindkapslede kardiolipinkompleks ved ekstensiv dialyse mod 0,9% NaCl i 4°C i 30 timer som beskrevet ovenfor.

Mængden af adriamycin opnået under disse betingelser blev bestemt ved fluorescens efter endt dialyse. Mængden af adriamycin-kardiolipinkompleks, der blev indkapslet i liposomer, var 55% (6,38 µmol) af den samlede tilførte dosis.

De forskellige lipider, som blev anvendt, blev opnået på følgende måde: Phosphatidylcholin (bovin) og phosphatidylcholin (æg), phosphatidylserin (bovin) og cholesterol blev leveret fra Sigma Chemicals Corp. (St. Louis, Missouri), og stearylamin blev leveret fra K & K Laboratories (New York, New York). Alle lipider blev anvendt som leveret og blev lagret ved -20°C. Adriamycin (MSC 123127) blev leveret af Developmental Therapeutic Branch, Divison of Cancer Treatment, National Cancer Institute. Alle andre kemikalier var af reagenskvalitet.

Eksempel 2 - Bestemmelse af vævsfordeling af adriamycin-kardiolipin-liposompræparater efter administration

Den fysiologiske fordeling af frit adriamycin og af liposomindkapslet adriamycin-kardiolipinkompleks blev bestemt i DBA/2 mus, der vejede 20-25 g. Musene blev injiceret med frit adriamycin og adriamycin-kardiolipin-kompleks indkapslet i liposo-

mer via halevenen i en dosis på 4 mg/kg og ved 2% legemsvægt. Med tidsmellemrum fra 5 minutter til 24 timer efter lægemiddeladministrationen blev mus åreladet gennem orbital sinus i hepaniserede rør. Plasma blev fraskilt øjeblikkeligt og lagret ved -20°C. Fire mus i hver behandlingsgruppe blev aflivet ved at vride halsen om, og hjerte, lever, nyrer, milt, lunger og tyndtarm blev hurtigt udskåret, skyllet i 0,9% NaCl og lagret ved -20°C indtil undersøgelse.

Plasma og væv blev analyseret ved hjælp af den fluorometriske metode ifølge Bachur et al., der er beskrevet i Cancer Chemother. Rep. 54, 89-94 (1970). Kort sagt blev plasma ekstraheret med 5 volumener 0,3 N HCl - 50% ethanol og væv blev homogeniseret med 20 volumener af den sure alkohol. Plasma og vævshomogenater blev centrifugeret ved 15.000 omdrejninger per min. i 10 minutter, og den klare overliggende fraktion blev undersøgt fluorometrisk i et Perkin Elmer-udstyr ved 470 nm excitation og 585 nm emission. Kontrolvæv opnået fra mus, der var behandlet med blindliposomer, blev undersøgt på lignende måde i fluorometeret for at korrigere for eventuelt endogen i fluorescens. Friske adriamycin-standarder blev fremstillet i 0,3 N HCl - 50% ethanol hver dag for at beregne koncentrationen af adriamycin i vævsprøverne.

Fig. 1 repræsenterer fordelingen af frit adriamycin og af adriamycin-kardiolipinkompleks, der er indkapslet i liposomer, i musehjerte, når der administreres intravenøst i en enkelt dosis på 4 mg/kg. Den maksimale lægemiddelkoncentration forekom i 30 minutter efter fri lægemiddeladministration; værdien er 8,3 µg/g kardialvæv. Den maksimale kardial lægemiddeloptagelse med adriamycin-kardiolipin-kompleks indkapslet i liposomer forekom imidlertid ved 5 minutter, idet lægemiddelækvivalenterne er 3,4 µg/g kardialvæv, hvilket kun er ca. 40% af den mængde, som blev observeret med frit adriamycin. Efter 1 times forløb var kardialkoncentrationerne af adriamycin-kardiolipin-kompleks indkapslet i liposomer uden betydning i sammenligning med levering af ækvivalent lægemiddel. Det viser

sig, at adriamycinlevering i kardiolipinkompleks indkapslet i liposomer selektivt hæmmer optagelsen af lægemiddel i kardialvæv på alle tidspunkter. Den samlede koncentration af lægemiddel, som kardialvævet blev udsat for i en periode på 24 timer, var desuden væsentligt reduceret, når adriamycin blev administreret bundet komplekst med kardiolipin og indkapslet i liposomer. Vævskoncentration x tid (C x T) værdier for 24 timers perioden af vævskoncentration for hjertet var 55,2 µg.time/g med adriamycin leveret i kardiolipinkompleks indkapslet i liposomer. Det er helt klart ud fra fig. 1, at kardiolipinkompleks indkapslede i liposomer af adriamycin hæmmer kardialoptagelsen af lægemidlet mere effektivt end positive liposomer dannet uden kardiolipin. C x T -værdierne for 24 timers perioden for de positive liposomer er 40 µg.time/g i sammmenligning med kun 4,2 µg.time/g for kardiolipin kompleks indkapslet i liposomer.

For at bestemme, hvorvidt den reducerede kardialoptagelse af adriamycin i kardiolipinkompleks indkapslet i liposomer hindrede kardiotoksicitet, blev der foretaget elektronmikroskopiske undersøgelser af dette organ. DBA/2 mus blev injiceret intravenøst med frit lægemiddel eller lægemiddel indesluttet i kardiolipinkompleks indkapslet i liposomer i en dosis på 15 mg/kg. Tre mus i hver gruppe blev aflivet ved at dreje halsen om på dem på dag 3, 5 og 7, og hjerterne blev øjeblikkeligt udtaget og anbragt i fysiologisk saltvand. Spidsen af venstre hjertekammer med en del af væggen blev udskåret og opdelt i 1 mm^3 blokke og fikseret i 2,5% glutaraldehyd pufret med 0,1 M cacodylat, pH 7,2 i to timer ved stuetemperatur. Prøverne blev skyllet i puffer, underkastet osmose i Bennett og Luft's kollidinpufret osmiumtetroxid, dehydratiseret i graduerede ethanoler og acetone og lejret i Epon. Til elektronmikroskopi blev først 1 µm Epon-sektioner farvet med alkalisk toluidinblåt, og passende arealer blev udvalgt til ultratynd sektionering, hvorefter tilfældige sektioner blev optaget på 200 mesh kobbergitre og behandlet med uranylacetat og blycitrat. Et JEOL 100 S elektronmikroskop med en accelerende spænding på 80 KeV blev anvendt til at betragte sektionerne.

Fig. 2 viser omfanget og graden af toksisk beskadigelse af myokardium af hjertevæv fra mus behandlet med frit adriamycin. I denne toksiske beskadigelse viser de enkelte myocytter de generative ændringer med vakuolering af det bløde endoplasmiske retikulum og tab af myofibriller. Fremadskridende beskadigelse kunne ses med større intensitet på dag 7 efter fri adriamycin-administration til mus. Mus behandlet med adriamycin-kardiolipin-kompleks indkapslet i liposomer havde imidlertid et total-udseende (fig. 3), som kunne sammenlignes med udseendet af kontrolvæv. Den kardiolipin-kompleksindkapslede liposomgruppe viste generelt et billede, som svarede til beskyttelse fra lægemidlet i de undersøgte områder, dvs. de væsentligste dele af vævet fremtrådte normalt, og der var kun mindre tab af parallel fibrillær anbringelse og myofilamenter i begrænsede fokalområder. Som vist i fig. 3 ses normal vaskulatur og interkalation af myocyter i kardiolipin-kompleks indkapslet i liposomer.

(Bemærk: Clearance af forekomst i nabostilling til vaskulatur x 4000).

Eksempel 3 - Bestemmelse af antitumorvirkning af præparater ifølge opfindelsen

For at bestemme hvorvidt indkapsling af adriamycin-kardiolipin-kompleks i liposomer reducerede antitumorvirkningen af lægemidlet, blev effektiviteten af liposomindkapslet adriamycin-kardiolipin-kompleks mod den murine P388 asketiske leukemi i DBA/2 mus undersøgt. Mus blev injiceret intraperitonealt med 1 x 10^5 celler af P388 leukemia. 24 timer efter tumorimplantering blev der til mus intraperitonealt administreret frit adriamycin eller kardiolipin-kompleks indkapslet i liposom i en dosis på 4 mg/kg. Kontrolmus fik 0,9% NaCl eller blindliposomer, der repræsenterer den samme koncentration af lipider som anvendt til at indkapsle adriamycin-kardiolipin-kompleks. Alle injektioner blev foretaget på 2% legemsvægt basis. Musene blev vejet på injektionsdagen, doser af lægemidler blev bereg-

net på basis af legemsvægten, og musenes overlevelsestid blev optalt i dage.

Tabel 1 viser effektiviteten af frit adriamycin og kardiolipin-kompleks indkapslet i liposomer på overlevelsen af mus med P388 tumor. Efter injektion med frit adriamycin i en dosis på 4 mg/kg intraperitonealt viste mus en T/C på 132% (T/C = behandlet kontra kontrol). Ved injektion af den samme dosis af adriamycin som af kardiolipin-kompleks indkapslet i liposompræparat ifølge opfindelsen fik man en overlevelsesrate på 125% T/C. Disse undersøgelser viser helt klart, at der ikke er noget tab af antitumorvirkning af adriamycin, når det bindes komplekst med kardiolipin og indkapsles i liposomer.

T a b e l 1

Virkning af frit og kardiolipin-kompleksindkapslet liposom-adriamycin på overlevelsen af DBA/2 mus med P388 tumor.

		T/C (%)	
Vej	Dosis (mg/kg)	Frit adriamycin	Adriamycin-kardiolipinkompleks indkapslet i liposomer
intraperitonealt	4	132	125

Mus, der vejede 20-25 g, fik intraperitonealt injektioner af 10^5 celler, og 24 timer senere blev der administreret frit adriamycin eller kardiolipin-kompleks indkapslet i liposomer.

Den foregående beskrivelse af opfindelsen har været rettet mod særlige detaljer ved opfindelsen med henblik på at forklare og belyse denne. Det vil imidlertid være indlysende for fagfolk

på dette område, at mange modifikationer og ændringer kan foretages.

P a t e n t k r a v.

1. Anthracyklinglycosid-kardiolipinkompleks, k e n d e t e g n e t ved, at det er indkapslet i liposomer, og at anthracyklinglycosidet er valgt blandt doxorubicin, daunorubicin og farmaceutisk acceptable derivater eller salte deraf.

2. Kompleks ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at liposomerne dannes ud fra phosphatidylcholin, cholesterol og stearylamin.

3. Kompleks ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at liposomerne er positive.

4. Kompleks ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at liposomerne er negative.

5. Fremgangsmåde til fremstilling af komplekset ifølge ethvert af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter, at man

(a) blander anthracyklinglycosidet med en mængde af kardiolipin, som er tilstrækkelig til at danne kompleks med anthracyklinglycosidet, således at der dannes et anthracyklinglycosid-kardiolipinkompleks;

(b) indkapsler komplekset i liposomer ved at blande komplekset med en lipidholdig opløsning, som danner liposomer ved denne blanding;

og derpå

(c) isolerer det indkapslede kompleks.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at man blander anthracyklinglycosidet med en mængde af kardiolipin i intervallet fra 30 til 70% baseret på vægten af anthracyklinglycosidet.

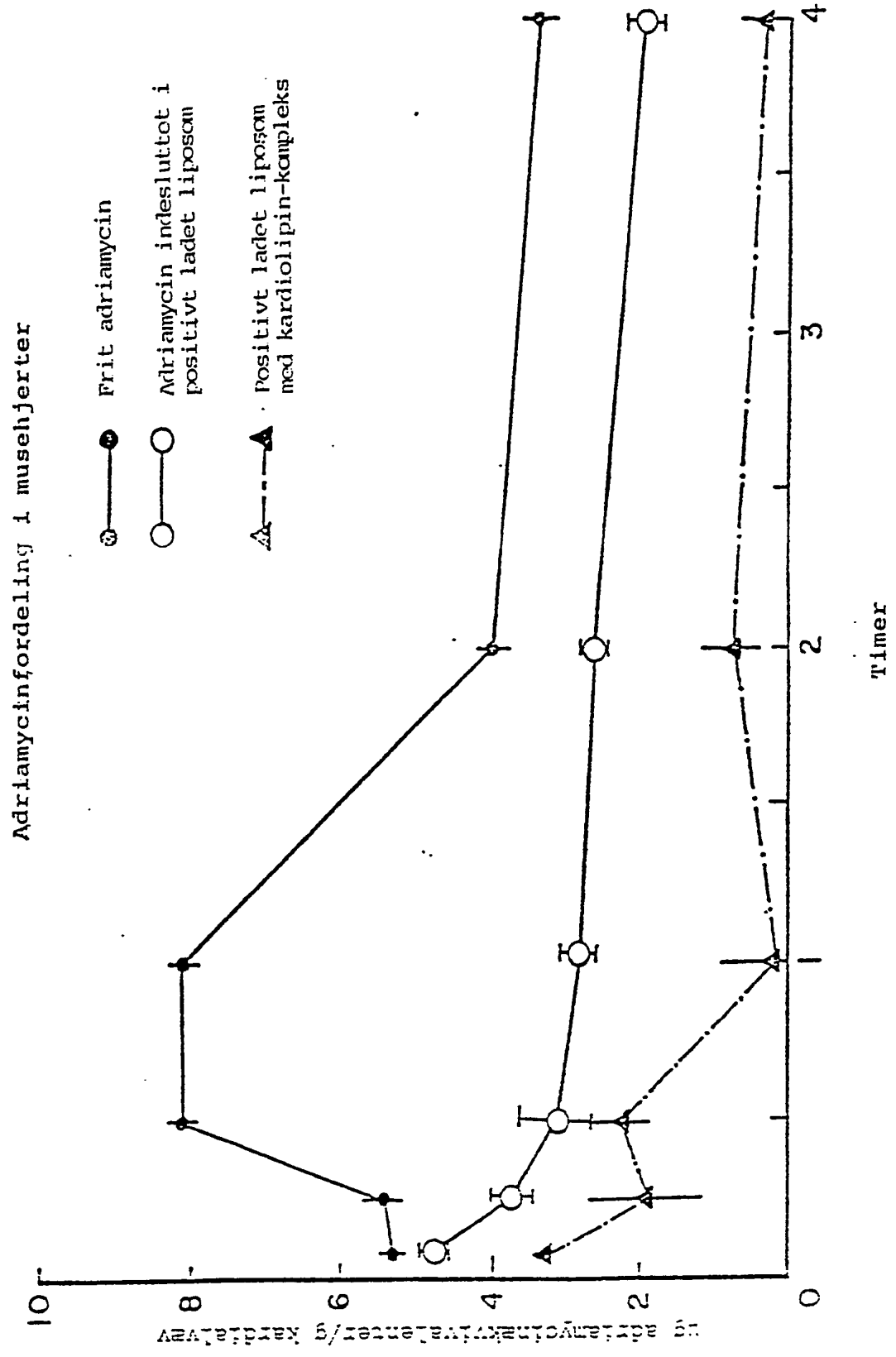
7. Fremgangsmåde ifølge krav 5 eller 6, k e n d e t e g n e t ved, at indkapslingen omfatter

(i) opløsning af komplekset i en lipidholdig opløsning omfattende phosphatidylcholin, cholesterol og stearylamin i et molært forhold på ca. 2,5:1,7:1 i forhold til mængden af glycosid, (ii) tørring af den resulterende blanding, (iii) dispergering af den tørrede blanding i en 0,9% natriumchloridopløsning i ca. 20 min. til dannelse af liposomer til indkapsling af komplekset.

8. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 5 til 7, k e n d e t e g n e t ved, at isoleringen omfatter dialysering over for 0,001 M phosphatbuffer med 0,85% natriumchlorid ved en pH-værdi på ca. 7,4 ved ca. 4°C i et tidsrum på ca. 30 timer med mindst 3 ændringer af bufferopløsning.

9. Terapeutisk præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter komplekset ifølge ethvert af kravene 1 til 4 sammen med en farmaceutisk acceptabel bærer.

FIG. 1


Adriamycinfordeling i musehjerter
Frit adriamycin
Adriamycin indesluttet i positivt ladet liposom
Positivt ladet liposom med kardiolipin-kompleks
µg adriamycinækvivalenter/g hjerte
Timer
0
2
4
6
8
10
1
2
3
4

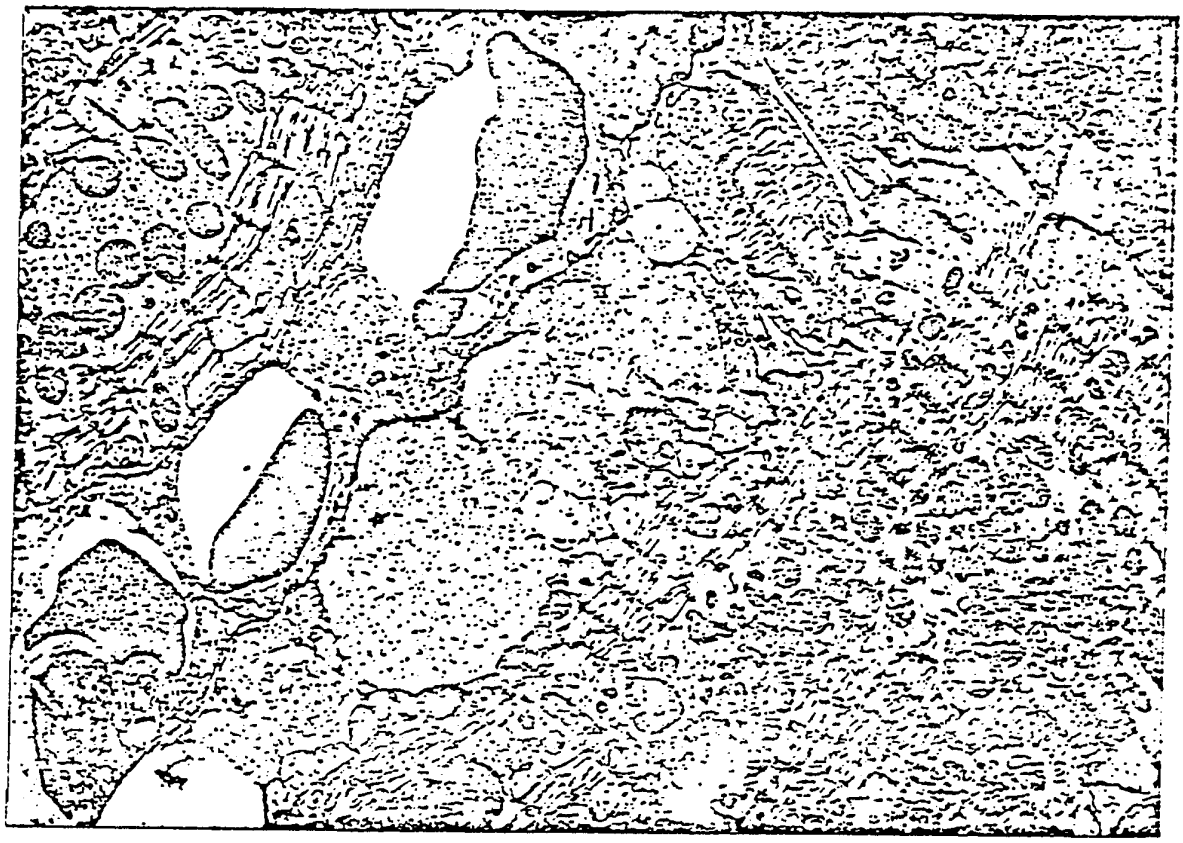


FIG. 2 Elektromikrofotografi af kardialvæv fra DBA/2 mus administreret 15 mg/kg, intravenøst, frit adriamycin, hvilket viser tab og fragmentation af myofilamenter med ledsagende klaring af organeller og opkvældning af sarcoplasmiske områder. Bemærk clearance af forekomst i nabostilling til vaskulatur x 4000.

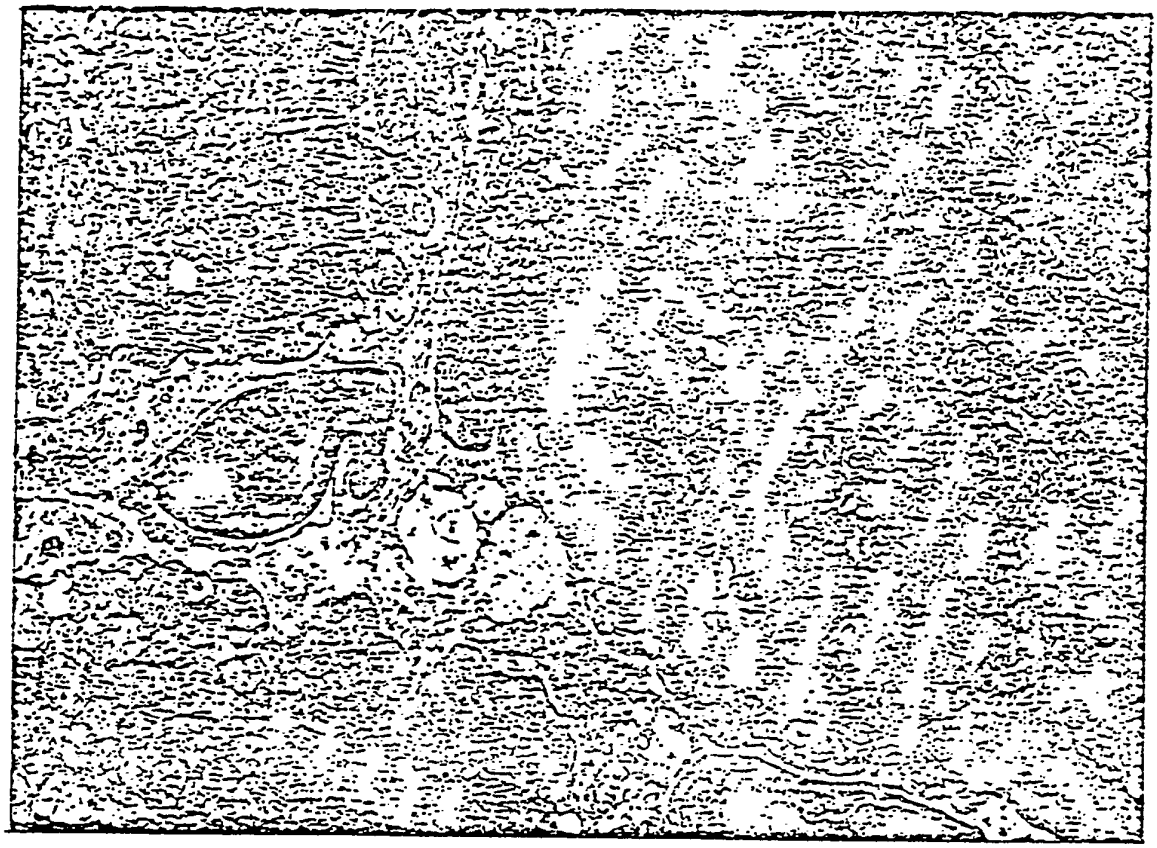


FIG. 3 Elektronmikrofotografi af kardialvæv fra DBA/2 mus givet 15 mg/kg intravenøst adriamycin indesluttet i kardiolipinliposomer. I alt væsentligt normalt udseende myokardium. Begrænset toksisk beskadigelse, der ses som vakuolisering, der ses i vaskulærforbundne væv mellem nabomyocyter.