



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **178653**

(13) **B**

(51) Int Cl⁶ A 61 K 47/44, 47/00, 9/127, 9/50

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	904456	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	13.04.89, PCT/DE89/00230
(22) Inng. dag	15.10.90	(85) Videreføringsdag	15.10.90
(24) Løpedag	13.04.89	(30) Prioritet	16.04.88, DE, 3812816
(41) Alm. tilgj.	15.10.90		
(44) Utlegningsdato	29.01.96		

(71) Patentsøker	Schering AG, D-13342 Berlin, DE
(72) Oppfinner	Rüdiger Lawaczek, Berlin, DE
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for fremstilling av liposomer og/eller biologiske celler, i hvilke er inkludert tilsetningstoffer**

(56) **Anførte publikasjoner** EP A2, A3 69307
WO 86/00238

(57) **Sammendrag** For å inkorporere, tilsette eller substituere stoffer i liposomer eller celler, anvendes gasser i gassformig eller væskeformig tilstand med et tilstrekkelig høyt trykk for å forårsake en reduksjon i lipidordenen. De ladete liposomer eller celler er egnede som farmasøytiske bærere.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av liposomer og/eller biologiske celler, som under fremstillingen absorberer eksterne tilsatte stoffer. I begge tilfeller foregår stoffabsorpsjonen under skånsomme betingelser. De ladede liposomer og/eller celler er egnet som målrettede bærere av farmasøytisk aktive forbindelser.

Liposomer er oppbygget av lipidmolekyler, fortrinnsvis fosfolipider. Disse danner i vandige medier spontant doble lipidlag som er anordnet i en lukket lamellaktig form. En eller flere lameller atskiller det indre rom fra den ytre løsning. Lipidenes polare, hydrofile hovedgrupper (f.eks. etanolamin på cefalin, cholin på lecitin) retter seg mot vannfasen, de ikke-polare hydrofobe fettsyrerester er rettet mot det indre av det doble lipidlag. Dobbeltlagene er to molekyllag 4 til 5 nm tykke. Liposomene atskilles etter størrelse og antall av lameller, og de inndeles i små, enkeltlamell-liposomer (small unilamellar vesicles (SUV)) med radier inntil 100 nm, store enkeltlamell-liposomer (large unilamellar vesicles (LUV)) med radier større enn 100 nm, så vel som multilamell-liposomer (multilamellar vesicles (MLV)). I en vandig fase samler fosfolipidene seg uten hjelp til multilamell-liposomer, og i en løkform anordnes flere doble lipidlag, som utskilles gjennom vannlagene, på multilamellene.

Dannelsen av lamellformede doble lipidlag er en følge av balansen mellom fysikalske krefter og steriske effekter. Det doble lipidlag danner også plasmamembranenes strukturelle element som omkranser biologiske celler og hvori det som den andre byggesten innføres proteiner i lipidmatriksen.

Liposomenes fysikalske og fysiologiske egenskaper er bestemt gjennom deres lipidsammensetning, størrelse, temperatur, pH, buffertype og styrke, fremstillingsbetingelser, historie og alder. Anvendelse av liposomer som er ladet med legemidler har vært gjenstand for stor interesse i diagnostikken og terapien. Liposomer åpner, som målrettede bærere av farmasøytisk aktive midler, nye diagnoseformer og terapiformer (se f.eks. R. Lawaczeck "Liposomen als zielgerichtete Pharmakaträger", Deutsche Apotheker Zeitung 127, 1771-1773 (1987), M.J. Ostro "Liposomers", Sci. Am. 256, 90-99 (1987)). Til farmasøytiske formål er permeabiliteten av lipidmembranen

og stabiliteten av liposomene av interesse; i tillegg er fusjonsevnen og kinetikken for celleabsorpsjonen fysiologisk viktig.

På grunn av denne brede interesse foreligger det et flertall publikasjoner som angår fysikken, kjemien, biologien, fremstillingen og anvendelsen av liposomer. En nylig utgitt oversiktsartikkel med farmasøytisk orientering er utgitt av D. Lichtenberg og Y. Barenholz ("Liposomes: preparation, characterization, and preservation" i Methods of Biochemical Analysis Vol. 33, 337-462 (1988)). Anvendelsen av celler som bærere av farmakologisk aktive forbindelser er blant annet beskrevet av C. Nicolau og medarbeidere ("Resealed red blood cells as a new blood transfusion product", Bibliothca haemat. 51, 82-91 (1985)).

Til fremstilling av uni- og oligolameller så vel som ladede liposomer er det utviklet forskjellige strategier (beskrevet av Lichtenberg & Barenholz), som skjematisk kan klassifiseres som 1. fysisk knusing ved hjelp av skjærkrefter og 2. kjemisk nedbrytning av de spontant dannede multilamell-liposomer ved hjelp av "hjelpermolekyler". Anvendelsen av skjærkrefter er ikke egnet ved inkludering av labile stoffer. Hjelpermolekyler er tilgjengelige i form av vaskemidler, eller organiske løsningsmiddel-molekyler. Ved deres hjelp dannes ikke-dobbeltag-aggregater av lipidmolekylene (for det meste miceller). Fjernelsen av hjelpermolekylene fører videre til de spontant dannede liposomale dobbeltag og samtidig til absorpsjon av tilsatte stoffer. Den fullstendige fjerning av vaskemiddel-molekylene er ofte vanskelig, dessuten kan en uønsket denaturering forhindres ved hjelp proteinholdige innleirings-molekyler. Absorpsjonen ved hjelp av biologiske celler kan oppnås ved hypo-osmolar sammenbryting av cellen (lysis) med etterfølgende innstilling av isotonien eller ved hjelp av elektrisk induert poredannelse. Ved dette absorberes eksternt tilgjengelige stoffer og innkapsles under lukkingen av membranen. En skånsom lysis under isotoniske, vaskemiddel- og spenningsfrie betingelser er hittil ikke kjent. Det foreligger derfor et behov for en fremstillingsfremgangsmåte for tilsetningsstoff-inneholdende liposomer og/eller biologiske celler som ikke oppviser de ovennevnte mangler. Denne oppgave løses

ved foreliggende oppfinnelse ved at liposomene eller de biologiske celler under et trykk inntil 1000 bar i et vandig medium behandles med lystgass (N_2O), halotan, argon, xenon, svovelheksafluorid (SF_6), alkaner som metan, etan, propan, butan, heksan, heptan, alkener som eten, propen, buten, heksen, hepten og/eller blandinger derav, i gassformig eller flytende tilstand under tilsetning av de ønskede tilsetningsstoffer, som ved stigende trykk fører til en tiltagende reduksjon i lipidordenen, etterfulgt av at trykket utjevnes til atmosfærisk trykk, eventuelt at liposomsuspensjonen presses gjennom et størrelsesselektivt filter for utjevning av trykket.

Det er ved foreliggende oppfinnelse funnet at en liposomal og/eller cellulær absorpsjon av stoffer, fortrinnsvis farmasøytisk aktive midler for terapeutiske og diagnostiske formål, overraskende også kan oppnås gjennom anvendelse av gassformige hjelpermolekyler. Denne fremgangsmåte oppviser ikke manglene ved de ovenfor angitte fremstillingsfremgangsmåter. Ved denne nye fremgangsmåte tilsettes en gass til den vandige lipid- eller cellesuspensjon, som foruten lipider eller celler inneholder det innesluttede stoff. Det dreier seg her om gasser med "vaskemiddellignende effekt", dvs. gasser som i motsetning til hydrostatisk trykk gir en nedsettelse av lipidmolekylordenen med stigende trykk og/eller fører til en oppløsning av membranen. Ved det anvendte trykk avventes innstillingen av den termodynamiske likevekt med den vandige lipid- eller cellesuspensjon. De anvendte gasser må være kjemisk inerte med hensyn til lipidfasen eller vannfasen og ikke som karbondioksid eller ammoniakk inngå i en vekselvirkning med vann. Fortrinnsvis anvendes lett håndterbare, teknisk tilgjengelige gasser, som ikke etterlater noen toksisk rest, i et trykkområde inntil 1000 bar, fortrinnsvis inntil 200 bar. En overskridelse av kokepunktskurven i p, T-diagrammet i flytende tilstand kan være fordelaktig. Egnede gasser er fortrinnsvis lystgass (N_2O), halotan, argon, xenon, svovelheksafluorid (SF_6), alkan som metan, etan, propan, butan, heksan, heptan, alken som eten, propen, buten, heksen, hepten. Ved lystgass velges et trykk inntil 55 bar, som er tilgjengelig i tekniske trykkbeholdere. Det tilgjengelige temperaturom-

råde ligger mellom de eventuelle fryse- og kokepunkter, fortrinnsvis 0 til 37 °C. De angitte gassmolekyler utøver en "vaskemiddellignende" effekt og fører til en åpning og/eller oppløsning av det doble lipidlag og/eller membranen. Under avspenningsfasen danner det seg spontant nye liposomer, eller membranene lukker seg på nytt, slik at de tilsatte stoffer absorberes. Denne prosess kan gjentas periodisk. En innsnevring av liposomstørrelsen er mulig ved filtrering av liposomene under atmosfærisk trykk gjennom et størrelsesselektivt filter. Lipidsammensetningen av liposomene kan optimeres etter terapeutisk og/eller diagnostisk anvendelighet og etter målstedet. Som biologiske celler kan anvendes blodceller som erythrocytter, leukocytter, lymfocytter og trombocytter, fortrinnsvis celler som er dyrket i kultur.

Fordelen ved liposomfremstillingen og celleladningen ved hjelp av "gasshjelpemiddel-teknikken" er som følger: Fremgangsmåten er teknisk lett å realisere og økonomisk gunstig. Gassmolekylene kan i motsetning til de konvensjonelle vaskemiddelmolekyler lett fjernes.

På grunn av deres inerte karakter og at det kun gjenblir spormengder, spiller toksisiteten av de anvendte molekyler kun en underordnet, eller ingen rolle.

Det er en fordel at fremgangsmåten utføres ved fysiologisk temperatur eller lavere.

Anvendelsen av de inerte gasser under de angitte trykkforhold er ikke skadelig for de fleste stoffer eller celler.

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse er egnet for liposomal og cellulær addisjon, inkorporering og/eller substitusjon av hydrofile og lipofile stoffer.

De ladede liposomer kan overflatemodifiseres og anvendes som målspesifikke eller organspesifikke bærere for farmakologisk aktive forbindelser eller for lagring av farmakologisk aktive forbindelser.

35

Eksempler

Eksempel 1:

20 mg dimyristoyl-lecitin løses i 1 ml kloroform. Denne løsning tilsettes til trykkbeholdere. Kloroformen av-

dampes med etterrenset nitrogen og deretter under vakuum. Det påfylles 2 ml vann inneholdende 1 mM karboksyfluorescin (renset og omkrystallisert fra etanol), og 20 mM tris-HCl innstilt til pH 8. CO₂ og O₂ utdrives ved skylling med lystgass. Trykk-
5 beholderen stenges og den tilpasses et lystgasstrykk på 50 bar ved romtemperatur. Løsningen omrøres i 1/2 time, og trykket utlignes deretter langsomt og isotermisk til atmosfærisk trykk. Fremgangsmåten gjentas fem ganger. Løsningen fjernes fra trykkbeholderen og passerer gjennom en anioneutbytter for
10 å fjerne det eksternt tilstedeværende karboksyfluorescin. Liposomfraksjonen inneholder det innesluttete fargestoff og kan anvendes til fluorescensstudier.

Eksempel 2:

15 Som eksempel 1, men i stedet for dimyristoyl-lecitin tilsettes 200 mg av en 4:1 blanding av eggeplommelecitin og kolesterolin. Karboksyfluorescin erstattes med 20 mM gadolinium-DTPA som MR-kontrastmiddel. De erholdte liposomer kan anvendes i MR-diagnostikken.

20

Eksempel 3:

Fremstilling av erythrocytter eller erythrocyttskall, som er ladet med karboksyfluorescin under blodisotoniske betingelser.

25

Friskt bovint blod vaskes tre ganger i PBS-buffer, pH 7,4, og alle andre bestanddeler enn erythrocytter fjernes. Den mørkerøde, tykke erythrocyttsuspensjon fortynnes med PBS-buffer inneholdende karboksyfluorescin slik at konsentrasjonen av karboksyfluoresciner 10^{-5} M. Løsningen overføres til en trykk-
30 målecelle. Etter vask med N₂O påføres et trykk på 50 bar N₂O ved 37 °C, og den optiske tetthet ved 675 nm følges. Mellom 400 og 600 minutter inntreffer lysis av cellene, tydelig synlig gjennom den typisk sigmoide reduksjon i optisk tetthet. Referansemålinger under atmosfærisk trykk, eller 50 bar hydro-
35 statisk trykk, viser i et tidsrom inntil 18 timer ingen lysis av erythrocyttene. Løsningene bringes langsomt tilbake til atmosfærisk trykk og undersøkes under mikroskop i synlig og fluorescerende lys. Disse erythrocytter oppviser før og etter lysis det typiske diskoide utseende. Ikke-lyserte celler

(kontroller) inneholder i motsetning til de i mellomtiden lyserte celler ikke noe karboksyfluorescin Cellefluorescensen er også etter omfattende vask uforanderlig synlig. Det er derfor åpenbart at erythrocyttene har absorbert fargestoffet i lysert tilstand under isotone betingelser og at dette for-
5 segles videre under trykkutjevningen.

Eksempel 4:

Som eksempel 3, med unntak av at saueerythrocytter
10 anvendes i stedet for bovine erythrocytter i 2 mM KH_2PO_4 , 9 mM Na_2HPO_4 , 3 mM KCL, 137 mM NaCl, pH 7,5. Lysen inntreer mellom 55 og 70 minutter. Resultatene er sammenlignbare med de fra eksempel 3.

15 Eksempel 5:

50 mg dipalmitoyllecitin tilsettes 2 ml av en 20 mM CaCl_2 -løsning og oppvarmes til en temperatur over faseovergangstemperaturen på 42 °C. Etter avkjøling til en temperatur under faseovergangstemperaturen fremstilles ifølge fremgangsmåten beskrevet i R. Lawaczeck, J. Membrane Biol. 51, 229-261
20 (1979), gjennom innvirkning av ultralyd, ikke utherdete vesikler. Til denne vesikkelsuspensjon tilsettes 0,5 mg insulin og løsningen overføres til en trykkbeholder temperert til 37 °C. Etter lukking av trykkbeholderen pålegges et overtrykk av
25 eten, slik at faseovergangstemperaturen, ved en konstant temperatur på 37 °C, nås og opprettholdes i 1/2 time. Deretter utherdnes vesikkelmembranen under ytterligere trykkøkning og som medfører at det doble lipidlag går over i flytende tilstand. Etter utjevning av trykket anbringes vesikkelsuspensjonen på en Sepharose 4b (Pharmacia)-søyle. De insulinholdige
30 vesikler atskilles fra ikke innkapslet insulin. På denne måte erholdes en utherdning av vesiklene og en overføring i flytende tilstand under isoterme betingelser, slik at f.eks. labile stoffer ikke utsettes for forhøyede temperaturer. Fordi
35 insulin først tilsettes etter fremstilling av de ikke-utherdete vesikler, utsettes det ikke for ultralyd.

Eksempel 6:

På samme måte som i eksempel 5 fremstilles en suspen-

sjon av ikke-utherdete vesikler av dimyristoyllecitin med 1 % tokoferol ifølge R. Lawaczeck, J. Membrane Biol. 52, 229-261 (1979), og det tilsettes 50 mM adenosintrifosfat ved nøytral pH. Løsningen tilsettes til en trykkbeholder og trykkbelastes ved å pålegge et overtrykk av svovelheksafluorid ved 20 °C. Trykket velges slik at membranen overføres fra den krystallinske fase til den flytende fase (den normale faseovergangstemperatur av denne lipidblanding ligger ved 23 °C). Etter trykkutjevning atskilles det frie adenosintrifosfat fra det innesluttete adenosintrifosfat ved hjelp av ionebytter.

Eksempel 7:

50 mg av en lipidblanding med sammensetningen dimyristoyllecitin:dimyristoylcefalin = 1:1 med faseovergangstemperaturer på 34 °C (fast) og 43 °C (flytende), løses i kloroform og tilsettes til en trykkbeholder ved 34 °C. Det tilsettes 3 ml 20 mM tris-HCl og 5 mM CaCl₂-buffer med 1 mg bovint hemoglobin. Etter lukking av trykkbeholderen trykkbelastes lipidløsningen periodisk med etan, slik at det samme trykkområde passerer ti ganger; Deretter utjevnes trykket til atmosfærisk trykk og liposomsuspensjonen applikeres på en S-1000-søyle (Pharmacia) for å fjerne ikke-innesluttet hemoglobin. Den hemoglobinholdige liposomfraksjon kan påvises ved den røde farge.

25

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av tilsetningsstoff-inneholdende liposomer og/eller biologiske celler, karakterisert ved at liposomene eller de biologiske celler under et trykk inntil 1000 bar i et vandig medium behandles med lystgass (N₂O), halotan, argon, xenon, svovelheksafluorid (SF₆), alkaner som metan, etan, propan, butan, heksan, heptan, alkener som eten, propen, buten, heksen, hepten og/eller blandinger derav, i gassformig eller flytende tilstand under tilsetning av de ønskede tilsetningsstoffer, som ved stigende trykk fører til en tiltagende reduksjon i lipidordenen, etterfulgt av at trykket utjevnes til

atmosfærisk trykk, eventuelt at liposomsuspensjonen presses gjennom et størrelsesselektivt filter for utjevning av trykket.

5 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsetningsstoffene
som opptas av liposomene eller de biologiske celler, er farma-
søytisk aktive forbindelser.

10 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsetningsstoffene
inkorporeres, adderes og/eller substitueres.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at de biologiske celler
er blodceller som erythrocytter, leukocyttter, lymfocytter og
trombocytter.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at de biologiske celler
er celler som opprettholdes i kultur og som har sin opprin-
nelse fra planteceller og/eller dyreceller og/eller mikro-
bielle celler.

25

30

35