



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

①9

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

①1 CH 652 615 A5

⑤1 Int. Cl.4: B 01 J 2/06
A 61 K 9/66
A 61 K 47/00
B 01 J 13/02

// A 61 K 31/685, 31/57

①2 PATENTSCHRIFT A5

②1 Gesuchsnummer: 6832/82	⑦3 Inhaber: Imperial Chemical Industries Limited, London SW1 (GB)
⑥2 Teilgesuch von: 5038/78	
②2 Anmeldungsdatum: 09.05.1978	⑦2 Erfinder: Evans, John Raymond, Macclesfield/Ches (GB) Fildes, Francis James Thomas, Macclesfield/Ches (GB) Oliver, Jean Elizabeth, Macclesfield/Ches (GB)
③0 Priorität(en): 10.05.1977 GB 19510/77	
②4 Patent erteilt: 29.11.1985	
④5 Patentschrift veröffentlicht: 29.11.1985	⑦4 Vertreter: A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

⑤4 Verfahren zur Herstellung eines gefriergetrockneten Gemisches von potentiellen Liposomen.

⑤7 Das gefriergetrocknete Gemisch von potentiellen Liposomen wird hergestellt, indem man ein wässriges Liposomenpräparat, das Wasser, mindestens ein Phospholipid und mindestens eine biologisch aktive Verbindung, z.B. Medikamente, Proteine, Enzyme, Hormone, Vitamine und Markierungsverbindungen, enthält, herstellt und hierauf das wässrige Liposomenpräparat gefriertrocknet. Ein Verfahren zur Herstellung eines wässrigen Liposomenpräparates, das mindestens eine biologisch aktive Verbindung enthält, besteht darin, dass man das gefriergetrocknete Gemisch von potentiellen Liposomen, das nach dem obigen Verfahren erhalten worden ist, in einem wässrigen Medium dispergiert. Das wässrige Liposomenpräparat dient als Träger der biologisch aktiven Verbindung(en).

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines gefriergetrockneten Gemisches von potentiellen Liposomen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein wässriges Liposomenpräparat, das Wasser, mindestens ein Phospholipid und mindestens eine biologisch aktive Verbindung enthält, herstellt und hierauf das wässrige Liposomenpräparat der Gefriertrocknung unterwirft.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das wässrige Liposomenpräparat ausserdem mindestens einen Hilfsstoff enthält.

3. Gefriergetrocknetes Gemisch von potentiellen Liposomen, hergestellt nach dem Verfahren nach Anspruch 1.

4. Gefriergetrocknetes Gemisch nach Anspruch 3, hergestellt nach dem Verfahren nach Anspruch 2.

5. Verfahren zur Herstellung eines wässrigen Liposomenpräparates, das mindestens eine biologisch aktive Verbindung enthält, dadurch gekennzeichnet, dass man ein gefriergetrocknetes Gemisch nach Anspruch 3 in einem wässrigen Medium dispergiert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man ein gefriergetrocknetes Gemisch nach Anspruch 4 in einem wässrigen Medium dispergiert.

Liposome sind in der Literatur vielfach beschrieben, und ihre Struktur ist allgemein bekannt. Üblicherweise besitzen sie eine zwiebelartige multilamellare Struktur aus einer Vielzahl von Phospholipid-Bischichten, die voneinander durch ein wässriges Material getrennt sind. Eine andere bekannte Liposomtype besteht aus einer einzigen Phospholipid-Bischicht, die ein wässriges Material einschliesst; diese unilamellaren Formen werden manchmal als «Vesikel» bezeichnet. In den letzten Jahren ergab sich ein wachsendes Interesse an der Verwendung von Liposomen als Träger für Verbindungen, die wegen der einen oder anderen biologischen Eigenschaft von Interesse sind, wie z. B. Medikamente, Proteine, Enzyme, Hormone, Vitamine und Markierungsverbindungen. Es wird darauf hingewiesen, dass für diese breite Gruppe von biologisch interessierenden Verbindungen, die Medikamente (menschliche und veterinäre) umfasst, aber nicht darauf beschränkt ist, in dieser Beschreibung die Bezeichnung «biologisch aktive Verbindungen» verwendet wird.

Die Einkapselung von biologisch aktiven Verbindungen in Liposome kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Bei dem Verfahren, das am üblichsten ist, wird ein Phospholipidfilm (mit oder ohne einem geladenen Lipid) durch Eindampfen einer Lösung in einem organischen Lösungsmittel, wie z. B. Chloroform, hergestellt und anschliessend in einem geeigneten wässrigen Medium dispergiert. Im Falle von lipidlöslichen biologisch aktiven Verbindungen, d. s. also solche, die sich mit den Lipidschichten und nicht mit der wässrigen Phase der Liposome assoziieren, wird die Verbindung üblicherweise als Film zusammen mit einem Phospholipid unter Verwendung eines üblichen organischen Lösungsmittels gegossen. Im Falle von wasserlöslichen biologisch aktiven Verbindungen wird die Verbindung üblicherweise in Liposome durch Dispergieren eines gegossenen Phospholipidfilms mit einer wässrigen Lösung der Verbindung eingekapselt. Die eingekapselte Verbindung wird dann von der freien Verbindung durch Zentrifugieren, Chromatografie oder ein anderes geeignetes Verfahren abgetrennt. In dem Fall, dass

die biologisch aktiven Verbindungen, welche sich mit der Lipidphase von Liposomen assoziieren, in einer Menge vorliegen, die unter der maximalen Lipidlöslichkeit oder unter der maximalen Menge, die durch das Lipid gebunden werden kann, liegt, enthalten Liposome, die durch das obige Verfahren hergestellt worden sind, üblicherweise den grössten Teil der Verbindung in den Lipid-Beschichtungen gebunden, weshalb die Abtrennung der freien Verbindung nicht so kritisch ist wie im Falle von wasserlöslichen biologisch aktiven Verbindungen, die sich nicht an das Lipid binden.

Das oben erwähnte Verfahren eignet sich nicht für die Anwendung im technischen Massstab. Ausserdem besitzen wässrige Liposomdispersionen nur eine beschränkte Stabilität, weshalb ihre Lagerfähigkeit beschränkt ist. Darüber hinaus können Liposome Aggregate bilden und als Sediment ausfallen. Zwar können solche Sedimente üblicherweise wieder dispergiert werden, jedoch kann die Struktur und die Grössenverteilung der ursprünglichen Dispersion verändert werden. Die Aggregation und Sedimentation kann durch die Einverleibung von geladenen Lipiden in die Liposome verringert werden, aber dies garantiert keine zufriedenstellende Lagerfähigkeit. Der Verlust der biologisch aktiven Verbindung aus den Liposomen in das äussere wässrige Medium ist ein weiterer Faktor, der die Anwendungsmöglichkeit dieser Präparate als praktische Dosierungsformen beschränkt. Dies gilt insbesondere für niedrigmolekulare wasserlösliche Verbindungen, jedoch können auch lipidlösliche Verbindungen teilweise in das äussere wässrige Medium gehen, bis ein Gleichgewicht erreicht ist. Wenn der Gehalt an Verbindung klein ist und/oder wenn das Volumen des äusseren wässrigen Mediums gross ist, dann kann dieser Verlust einen beträchtlichen Anteil des Gesamtgehalts der biologisch aktiven Verbindung in den Liposomen ausmachen.

Alle diese Faktoren beschränken die Verwendung von Liposomen als praktische Träger für biologisch aktive Verbindungen, insbesondere in der medikamentösen Therapie. Eine Lösung könnte darin liegen, den Film aus Lipid und biologisch aktiver Verbindung herzustellen und zu lagern und dann bei Bedarf erst kurz vor der Anwendung unter Bildung von Liposomen zu dispergieren. Jedoch macht die Herstellung und Lagerung eines Films in einer Einheitsdosis ernsthaft praktische Schwierigkeiten, weshalb diese Idee keine praktische Lösung der oben aufgeführten Probleme liefert. Die vorliegende Erfindung befasst sich nunmehr mit einem Verfahren, das eine praktische Lösung ergibt. Kurz gesagt, das Verfahren besteht darin, dass man (1) ein wässriges Liposomenpräparat herstellt, das Präparat gefriergetrocknet, das gefriergetrocknete Gemisch dann lagert und bei Bedarf (2) in einem wässrigen Medium dispergiert, um ein wässriges Liposompräparat herzustellen.

Jedes geeignete Gefriertrocknungsverfahren kann bei der Ausführung des erfindungsgemässen Verfahrens verwendet werden. Der Kürze wegen wird in der Folge der Ausdruck «gefriergetrocknete Gemische von potentiellen Liposomen» für die gefriergetrockneten Gemische verwendet, die gemäss der Erfindung erhalten werden und die bei Dispergierung in einem geeigneten wässrigen Medium die gewünschten wässrigen Liposompräparate liefern. Unerwarteterweise wurde festgestellt, dass Liposome gebildet werden, die denjenigen ähnlich sind, die durch das bekannte Filmdispergierungsverfahren erhalten werden, wenn man ein gefriergetrocknetes Gemisch von potentiellen Liposomen gemäss der Erfindung wieder in einem geeigneten wässrigen Medium dispergiert. Im Falle einer lipidlöslichen oder lipidgebundenen biologisch aktiven Verbindung wird diese Verbindung weitgehend wieder in die Liposome inkorporiert. Andererseits ist das erfindungsgemässe Verfahren, wie weiter unten erörtert, nicht so für solche wasserlösliche biologisch aktive Verbindungen

geeignet, die sich nicht an das Lipid binden. Die gefriergetrockneten Gemische dispergieren sich leicht, wenn sie mit einem wässrigen Medium geschüttelt werden, und es scheint, dass sie zu Liposompräparaten führen, die eine engere Größenverteilung aufweisen als entsprechende Präparate, die durch Dispergieren eines gegossenen Films erhalten werden. Dies kann hinsichtlich der Reproduzierbarkeit des Effekts der Liposompräparate von Vorteil sein.

Gegenstand der Erfindung ist also ein Verfahren zur Herstellung eines gefriergetrockneten Gemischs von potentiellen Liposomen, welches dadurch ausgeführt wird, dass man ein wässriges Liposomenpräparat, das Wasser, mindestens ein Phospholipid, mindestens eine biologisch aktive Verbindung und gegebenenfalls mindestens einen Hilfsstoff der im folgenden definierten Art enthält, herstellt und hierauf das wässrige Liposomenpräparat gefriergetrocknet, um ein gefriergetrocknetes Gemisch von potentiellen Liposomen herzustellen.

Das genannte wässrige Liposomenpräparat kann z. B. nach dem oben erwähnten Filmdispersierungsverfahren hergestellt werden.

Beispiele für geeignete Phospholipide sind die natürlichen Lecithine, z. B. Eilecithin oder Sojabohnenlecithin, oder synthetische Lecithine, wie z. B. gesättigte synthetische Lecithine, z. B. Dimyristoyl-phosphatidyl-cholin, Dipalmitoyl-phosphatidyl-cholin oder Distearoyl-phosphatidyl-cholin, oder ungesättigte synthetische Lecithine, wie z. B. Dioleoyl-phosphatidyl-cholin oder Dilinoleoyl-phosphatidyl-cholin. Es kann entweder ein einziges Phospholipid oder ein Gemisch von Phospholipiden verwendet werden.

Wie oben bereits angedeutet, kann die biologisch aktive Verbindung irgendeine Verbindung mit einer Eigenschaft von biologischem Interesse sein. So kann die Verbindung ein Medikament, ein Protein, ein Enzym, ein Hormon, ein Vitamin oder eine Markierungsverbindung sein. Es wird darauf hingewiesen, dass das erfindungsgemäße Verfahren sich besonders im Falle von lipidlöslichen oder lipidgebundenen biologisch aktiven Verbindungen (welche einige wasserlösliche Verbindungen umfassen, wie z. B. gewisse Proteine) eignet. Das erwähnte Verfahren ist nicht so geeignet für wasserlösliche, nicht lipidgebundene biologisch aktive Verbindungen, da in diesen Fällen nur ein verhältnismässig kleiner Anteil der Verbindung bei der Dispergierung des gefriergetrockneten Gemischs wieder in die Liposome inkorporiert wird. Aber trotzdem kann dieser Nachteil hingenommen werden, wenn ein geeigneter Überschuss der wasserlöslichen biologisch aktiven Verbindung in das gefriergetrocknete Gemisch einverleibt wird. Wenn die Anwesenheit von freier biologisch aktiver Verbindung im äusseren wässrigen Medium von Nachteil ist, dann muss bei der Herstellung von Liposomen aus einem solchen Gemisch die freie Verbindung durch eines der oben erwähnten Verfahren entfernt werden. Somit hängt die Eignung des erfindungsgemässen Verfahrens im Falle von wasserlöslichen, nicht lipidgebundenen biologisch aktiven Verbindungen von allen relevanten Tatsachen ab, wie z. B. (1) der Natur der Aktivität der Verbindung, (2) der Wirkungsstärke der Verbindung, (3) der Menge der Verbindung, die beim erfindungsgemässen Verfahren in das Liposompräparat einverleibt wird, und (4) der Erwünschtheit von freier Verbindung im äusseren wässrigen Medium.

Die fakultativen Hilfsstoffe bestehen aus (1) Substanzen, von denen dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt ist, dass sie eine negative Ladung liefern, wie z. B. Ei-Phosphatidinsäure, Dipalmitoyl-phosphatidinsäure, Dicitylphosphat oder Rinderhirngangliosid, (2) Substanzen, von denen der Fachmann auf diesem Gebiet bekannt ist, dass sie eine positive Ladung liefern, wie z. B. Stearylamin oder Stearylamin-

acetat, und (3) Substanzen, von denen dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt ist, dass sie die physikalischen Eigenschaften der Lipidbischichten in den Liposomen in erwünschter Weise beeinflussen, sie beispielsweise nach Bedarf flüssiger oder fester machen, wie z. B. Cholesterin.

Gemäss der Erfindung wird ausserdem ein Verfahren zur Herstellung eines wässrigen Liposompräparats, das mindestens eine biologisch aktive Verbindung der vorstehend definierten Art enthält, vorgeschlagen, welches dadurch ausgeführt wird, dass man ein gefriergetrocknetes Gemisch von potentiellen Liposomen, das nach dem weiter oben beschriebenen Verfahren erhalten wurde, in einem wässrigen Medium dispergiert.

Ein geeignetes wässriges Medium ist beispielsweise destilliertes Wasser, isotonische Kochsalzlösung oder eine sterile oder nicht-sterile Pufferlösung.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1:

16,1 mg Eilecithin, 2 mg Ei-Phosphatidinsäure und 1,66 mg ^3H -Cortisol-21-palmitat (im folgenden « ^3H -CP») wurden in 5 ml Chloroform aufgelöst, und die Lösung wurde in einen 250 ml fassenden Rundkolben gegossen. Das Lösungsmittel wurde bei Raumtemperatur durch Drehen des Kolbens und Einblasen eines trockenen Stickstoffstroms entfernt. Der dabei erhaltene Lipidfilm wurde dann bei Raumtemperatur in 5 ml Wasser dispergiert, wobei ein Liposompräparat entstand. Duplikatproben von jeweils 50 μl wurde für Szintillationszählung entnommen. Der Rest des Liposompräparats wurde in einem Ultrazentrifugenröhrchen mit destilliertem Wasser auf 25 ml verdünnt und 30 min bei 120 000 g ultrazentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde vom Liposompfropfen entfernt, und der Pfropfen wurde in 5 ml destilliertem Wasser dispergiert. Duplikatproben von 50 μl dieser Dispersion wurden genommen, und die Steroidinkorporation wurde durch Szintillationszählung gemessen. Der Rest der Liposomdispersion wurde gefroren, wobei ein Methanol/Trockeneis-Gemisch verwendet wurde, und das Lösungsmittel wurde auf einem üblichen Gefrier-trockner entfernt. Auf diese Weise wurde ein gefriergetrocknetes Gemisch von potentiellen Liposomen erhalten.

Das gefriergetrocknete Gemisch wurde 5 Tage gelagert, worauf 5 ml einer 0,9%igen (G/V) Kochsalzlösung zugegeben wurden. Liposome wurden durch mässiges Schütteln des Gemisches in einem Kolben bei Raumtemperatur hergestellt. Mikroskopische Prüfung bestätigte die Anwesenheit von Liposomen. Zwei Tage später wurden die Liposome zweimal mit 0,9%iger (G/V) Kochsalzlösung durch das oben beschriebene Verfahren gewaschen, wobei jedoch Kochsalzlösung anstelle von Wasser verwendet wurde. Der Steroidgehalt der Liposome wurde durch Szintillationszählung bestimmt. Ein Vergleich der Radioaktivität der Dispersionen vor und nach der Gefrier-trocknung zeigte, dass 72% des im gewaschenen Präparat vor der Gefrier-trocknung vorhandenen Steroids in den gewaschenen Liposomen, die nach der Gefrier-trocknung hergestellt worden waren, zurückgehalten wurden.

Beispiel 2:

29,8 mg Dipalmitoyl-phosphatidyl-cholin (im folgenden «DPPC») und 3,32 mg ^3H -CP wurden in 5 ml Chloroform aufgelöst und als dünner Film auf die Wandung eines 250 ml fassenden Rundkolbens gegossen, indem das Lösungsmittel bei Raumtemperatur unter Verwendung eines trockenen Stickstoffstroms abgedampft wurde. 10 ml destilliertes Wasser wurden dann in den Kolben eingebracht, und das Gemisch wurde auf einem Wasserbad auf 70°C erhitzt. Liposo-

me wurden durch Bewegen des heissen Gemisches auf einer Vibromischerbank gebildet. Duplikatproben von jeweils 50 µl der resultierenden Dispersion wurden für Szintillationszählung entnommen. Der Rest der Dispersion wurde 2mal durch Verdünnen auf 25 ml mit destilliertem Wasser gewaschen und dann 3 min bei 120 000 g ultrazentrifugiert. Der gewaschene Liposompfropfen wurde wieder in 10 ml destilliertem Wasser dispergiert, und Duplikatproben von jeweils 50 µl wurden für Szintillationszählung entnommen. 5 ml der Dispersion wurden in einem Gefriergemisch, das aus Methanol und Trockeneis bestand, gefroren, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum und unter Verwendung eines üblichen Gefriertrockners entfernt. Auf diese Weise wurde ein gefriergetrocknetes Gemisch von potentiellen Liposomen erhalten, das gelagert wurde, bis es gebraucht wurde.

5 ml destilliertes Wasser wurden dem gefriergetrockneten Gemisch zugegeben, und das resultierende Gemisch wurde auf einem Wasserbad auf 70 °C erhitzt und mässig geschüttelt. Mikroskopische Prüfung der resultierenden milchigen Suspension zeigte, dass sie aus einer Liposomsuspension mit einer engen Grössenverteilung bestand. Diese Suspension wurde 30 min bei 120 000 g ultrazentrifugiert, und der Liposompfropfen wurde dann wieder in 5 ml destilliertem Wasser dispergiert. Duplikatproben von jeweils 50 µl der resultierenden Suspension wurden zur Bestimmung des endgültigen Steroidgehaltes der Liposome entnommen. Szintillationszählung zeigte, dass 78% des in der ursprünglichen gewaschenen Dispersion vorhandenen Steroids in dem fertigen gewaschenen Liposompräparat, das aus dem gefriergetrockneten Gemisch hergestellt worden war, vorlagen.

Duplikatproben von 6 mg getrockneter Liposompfropfen, die (a) aus dem ursprünglichen Film und (b) aus dem gefriergetrockneten Gemisch hergestellt waren, wurden dann in Probenhalter für Differentialabstastkalorimetrie (in der Folge mit «DSC» abgekürzt) eingewogen. Die DSC-Spektren der Gemische zwischen 0 und 50 °C wurden auf einem Perkin Elmer-Differentialabstastkalorimeter ermittelt. Vergleichsproben für DSC wurden ebenfalls hergestellt, indem die gleichen Gewichte an DPPC und ³H-CP wie im ursprünglichen Gemisch gemischt wurden und hierauf 50 Gew.-% Wasser eingemischt wurden. Sie dienten als «liposomfreie» Vergleichsgemische. Die DSC-Spektren dieser Vergleichsgemische wurden wie oben beschrieben gemessen.

Das DSC-Spektrum von DPPC alleine besteht aus einer Hauptübergangsendotherme bei 41 °C und einer Vorübergangsendotherme bei 35 °C. Die Breite einer Linie in halber Spitzenhöhe der Hauptendotherme beträgt annähernd 3 °C. Die oben beschriebenen Experimente zeigten, dass in den liposomfreien Vergleichsgemischen beide Spitzen in den DSC-Spektren der Gemische zu beobachten waren und die Linienbreite bei ungefähr 3 °C blieb. Dies zeigt vermutlich, dass in einfachen Gemischen (d. h. liposomfreien Gemischen) das Steroid das DSC-Spektrum des Lipids nicht verändert. Die Spektren der Duplikatliposompräparate zeigten nur einen Übergang (der Hauptendotherme), und die durchschnittliche Linienbreite dieser Präparate war 5,8 °C, was eine beträchtliche Verbreiterung im Vergleich zu den Vergleichsgemischen bedeutet. Diese Verbreiterung ergibt sich aus der molekularen Wechselwirkung des Lipids und des Steroids in den Liposomen, die durch das obige Verfahren hergestellt worden sind. Deshalb besteht kein Zweifel, dass sowohl das aus dem ursprünglichen Film als auch das aus dem gefriergetrockneten Gemisch hergestellte Liposomenpräparat das Steroid in den Liposomen enthielten.

Beispiel 3:

15 mg Eilecithin, 2,09 mg Cholesterin und 1,55 mg Dicytylphosphat wurden in 5 ml Chloroform aufgelöst und als dünner Film auf die Wandungen eines Probenröhrchens gegossen. 0,1 mg ¹²⁵J-Angiotensin-II in 1 ml 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden in das Probenröhrchen eingebracht. Das Lipid wurde in dem wässrigen Medium unter Zuhilfenahme einer Vibromixerbank dispergiert, wobei Liposome gebildet wurden. Die Liposomdispersion wurde dann 2mal gewaschen. Hierzu wurde sie zunächst mit 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) auf 26 ml verdünnt und dann 1 st bei 120 000 g einer Ultrazentrifugierung unterworfen. Dann wurde der gewaschene Liposompfropfen wieder in 5 ml 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) dispergiert. Duplikatproben von jeweils 0,25 ml wurden für Szintillationszählung entnommen. 4 ml der verbleibenden Suspension wurden in ein Probenröhrchen eingebracht, gefroren (Methanol/Trockeneis) und gefriergetrocknet. Das resultierende gefriergetrocknete Gemisch von potentiellen Liposomen wurde in 2 ml 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) suspendiert und zweimal wie oben gewaschen. Der gewaschene Liposompfropfen wurde erneut in 4 ml 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) suspendiert. Duplikatproben von jeweils 0,25 µl wurden für Szintillationszählung entnommen. 26% der anfänglichen Menge an Angiotensin-II lagen in den Liposomen nach der ersten Liposomherstellung und Wassung vor. 28% von diesen 26%, das sind 7%, der Anfangsmenge an Angiotensin-II, wurden in den Liposomen nach der Gefriertrocknung und Rekonstituierung festgehalten.

Der in diesem Beispiel und in Beispiel 4 verwendete 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurde hergestellt durch Auflösen von 0,895 g Kalium-dihydrogen-phosphat und 4,765 g Dinatriumhydrogen-phosphat-dihydrat in destilliertem Wasser und Auffüllen der Lösung auf 1 l mit destilliertem Wasser.

Beispiel 4:

15 mg Eilecithin, 2,09 mg Cholesterin und 1,55 mg Dicytylphosphat wurden in 5 ml Chloroform aufgelöst und als dünner Film auf die Wandung eines Probenröhrchens gegossen. 5 mg ³H-Inulin in 1 ml 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden dem Röhrchen zugegeben. Das Lipid wurde in der Inulinlösung unter Hilfe einer Vibromixerbank dispergiert, um Liposome herzustellen. Die Liposomdispersion wurde 2mal dadurch gewaschen, dass sie zunächst mit 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) auf 26 ml verdünnt und dann 1 st bei 120 000 g ultrazentrifugiert wurde. Der gewaschene Liposompfropfen wurde dann wieder in 2,1 ml 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) dispergiert. Hierauf wurden Duplikatproben von jeweils 1 µl für Szintillationszählung entnommen. Die verbliebene Suspension wurde gefroren (Methanol/Trockeneis-Gemisch) und in einem Probenröhrchen gefriergetrocknet. Das resultierende gefriergetrocknete Gemisch von potentiellen Liposomen wurde wieder in 1 ml 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) suspendiert, um Liposome herzustellen, und dann zweimal wie oben gewaschen. Der gewaschene Liposompfropfen wurde wieder in 2 ml 3,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) suspendiert, und Duplikatproben von jeweils 1 µl wurden für Szintillationszählung entnommen. 21% der anfänglichen Menge an Inulin wurden in den Liposomen nach der ersten Liposomherstellung und Wassung zurückgehalten. 17% von diesen 21%, das sind also 4%, der Ausgangsmenge an Inulin wurden in den Liposomen nach der Gefriertrocknung und Rekonstituierung festgehalten.