

00000

Eljárás kapszulázandó idegen anyagok iránt fokozott befogó-  
kapacitással bíró liposzómák előállítására

SINTETICA SA, Mendrisio, Svájc

A bejelentés napja: 1992. 08. 10.

62458

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/PCT/EP91/02377

Elsőbbsége: 1990. 12. 11.

## KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

### K I V O N A T

A találmány tárgya eljárás vizet vagy igen híg oldatokat kapszulázva tartalmazó liposzóma hólyagocskák előállítására, továbbá ezen "üres" liposzómák hatóanyaggal vagy diagnosztikai szerrel való töltésére. A töltés során a kapszulázandó anyagot a hordozó folyadékba beviszik, és homogénen eloszlatják, és olyan hőmérsékleten inkubálják, amely a membrán lipid  $T_c$  átmeneti hőmérsékletét meghaladja, és az inkubálást olyan időtartamon át végzik, amely alatt a kapszulázandó anyag a hólyagocska magjába transzmembrán permeációval behatol. Az ilyen "üres" liposzómák transzmembrán permeációval való töltése jó hozamú.

Mészáros L.

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

KÉPVISELŐ:

DANUBIA SZABADALMI ÉS

VÉDJEGY IRODA KFT

BUDAPEST

NSZO<sup>5</sup>: AG1K 9/127

AG1K 49/00

62458

Eljárás kapszulázandó idegen anyagok iránt fokozott befogó-  
kapacitással bíró liposzómák előállítására

SINTETICA SA, Mendrisio, Svájc

Feltalálók:

SCHNEIDER Michel,

Troines, Svájc

TOURNIER Hervé,

Valleiry, Franciaország

HYACINTHE Roland,

Aubonne, Franciaország

GUILLOT Christian,

Le Chable-Beaumont, Franciaország

LAMY Bernard,

Genf, Svájc

A bejelentés napja: 1992. 08. 10.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/PCT/EP91/02377

Elsőbbsége:

1990. 12. 11. (90 810 969.7)

Európa

75281-6674-GÁ/KmO

A találmány tárgya javított transzmembrán töltési kapacitással bíró liposzómák. A találmány tárgyát képezi az ilyen liposzómák készítésére szolgáló eljárás is, valamint ezek töltése az érdeklődésre számottartó anyagokkal.

Mint ismeretes, a liposzómák apró hólyagocskákból állnak, amelyeket lamelláris lipidekből álló membrán fal határol, és ez a fal egy magot vesz körül, amely befogott vizes folyékony fázissal van töltve. A liposzóma hólyagocskák megtölthetők idegen anyagokkal, például gyógyszerekkel, és ezt követően felhasználhatók az ilyen kapszulázott gyógyszerek szelektív szállítására a test meghatározott szerveibe. Ha a liposzómák vizes hordozóanyagban szuszpendáltak, különösen alkalmasak arra, hogy a hatóanyagot a betegbe parenterális, perorális, helyi vagy inhalációs adagolással vigyék be. A liposzomás gyógyszer készítmények javíthatják a kezelés hatékonyságát, nyújtott hatású terápiás aktivitást biztosítanak, növelik a terápiás arányt, és csökkenthetik az adott betegség vagy rendellenesség kezelésére összességében szükséges gyógyszer mennyiségét. Ennek részletes ismertetése a Liposomes as Drug Carriers by G. Gregoriadis, Wiley & Sons, New-York (1988) szakirodalmi helyen szerepel.

Számos módszer létezik liposzómák készítésére, és ezek érdeklődésre számottartó idegen anyagokkal való töltésére, ezen módszerek közül a legtöbb abban áll, hogy a liposzóma hólyagocskákat egy vizes hordozóanyag folyadékban hozzák létre, amely folyadék a fenti anyagokat eloszlatva tartalmazza. A liposzómák képződése során a hordozó folyadék egy része a hólyagocskába befogódik, természetesen a kapszulázandó kívánt anyag egy kis részével együtt. Ezt az eljárást nevezik "passzív

befogás"-nak. A liposzómák töltése a passzív módon befogott vizes fázissal gyakran meglehetősen alacsony hatékonyságú, mivel erősen függ a hordozó fázis természetétől, és, különösen, a hordozó fázisban oldott anyagok koncentrációjától, amelyek befolyásolhatják a liposzóma képződés hozamát. A gyógyszer szállítás célját tekintve azonban a töltési hatékonyság (amelyet általában úgy határoznak meg, mint a befogott anyag tömege a műveletben alkalmazott összes anyag tömegéhez viszonyítva) általában nem kritikus, mivel a be nem fogott anyag általában visszanyerhető és ismételten felhasználható; ennek folytán a jelentős tényező inkább a hasznos befogott anyag aránya a befogáshoz alkalmazott lipidek tömegére vonatkoztatva, azaz a liposzóma membrán képzésében résztvevő lipidekre vonatkoztatva. Pontosítva a célt, az új gyógyszerek vagy diagnosztikai reagensek kifejlesztésénél nagy előny, ha minimalizálni lehet a beinjektált lipid holt-tömeget, azaz, ha a betegnek beadandó gyógyszerhordozó-anyag tömegét a lehető legalacsonyabb szinten lehet tartani egy adott mennyiségű terápiásan hatásos anyag mellett. Nyilvánvaló, hogy a kapszulázott anyag tömegének a kapszulázó lipidekhez viszonyított tömege egyenes arányban áll az úgynevezett befogott térfogattal, azaz a liposzóma tömegére vonatkoztatott, a liposzóma magba befogott vizes fázis térfogatával ( $\mu\text{l}/\text{mg}$ ).

Egy klasszikus passzív befogási eljárás szerint, amelyet BANGHAM és mtsai., [J. Mol. Biol. 12, 238 (1965)] írnak le, az érdeklődésre számottartó vegyületet tartalmazó vizes fázist a reakcióedény falán elhelyezkedő szárított foszfolipid-filmmel hozzák érintkezésbe. Mechanikus keverés esetén a lipidek meg-

duzzadása folytán multilamelláris hólyagocskák (az angol elnevezés alapján rövidítése MLV) képződnek. Az MLV-ben befogott térfogat alacsony, jellemzően  $2 - 4 \mu\text{l/mg}$  lipid. Ultrahangos kezelés révén az MLV-k átalakíthatók apró, unilamelláris hólyagocskákká (SUV), amelyek által befogott térfogat még kisebb, például  $0,5 - 1 \mu\text{l/mg}$  közelében van. Leírtak más eljárásokat is nagyobb befogott térfogattal bíró liposzómák előállítására, különösen nagy unilamelláris hólyagocskák (ULV) előállítására. Ilyen eljárást írnak le például DEAMER & BANGHAM [Biochim. Biophys. Acta 443, 629, (1976)]. Eljárásuk szerint a membránképző lipideket éterben oldják, és ahelyett, hogy először az étert bepárolnák, hogy vékony filmet nyerjenek a felületen, majd ezt a filmet hoznák érintkezésbe a kapszulázandó vizes fázissal, az éteres oldatot közvetlenül injektálják a vizes fázisba, és az étert ezt követően párologtatják el, miáltal  $14 \mu\text{l/mg}$  befogott térfogatot tartalmazó liposzómákat nyernek. Ismeretes az úgynevezett fordított fázisú bepárlás (REV) módszere is, amelyet SZOKA & PAPAHA DJOPOULOS [P.N.A.S. 75, 4194 (1978)] ismertetnek, és amely eljárásban a lipideknek egy vízben oldhatatlan szerves oldószerben készült oldatát emulgeálják egy vizes hordozóanyag fázisban, és a szerves oldószer ezt követően vákuumban eltávolítják, így  $8 - 15 \mu\text{l/mg}$  lipid befogott térfogatot tartalmazó liposzómákat nyernek.

Javított passzív befogást értek el a liposzómáknak fokozatos dehidratálásával és rehidratálásával vagy fagyasztásával és kiolvasztásával; a dehidratálást elgőzöltetéssel vagy fagyasztva-száritással végzik. Ilyen eljárást ismertetnek például KIRBY & GREGORIADIS [Biotechnology, 1984, November 979-

984]. SHEW & DEAMER [Biochim. et Biophys. Acta 816 1-8 (1985)] is azt írják le, hogy ultrahang kezeléssel készített liposzómákat a kapszulázandó oldható anyagot tartalmazó vizes oldattal elegyítenek, és az elegyet nitrogéngáz atmoszférában forgó lombikban szárítják. Rehidratálásnál nagy liposzómák képződnek, amelyekben az oldható anyag jelentős frakciója kapszulázott.

További kísérleteket végeztek a liposzómákba befogott anyag mennyiségének növelésére az anyag magasabb koncentrációinak hordozó folyadékban való alkalmazásával, ezek a kísérletek kevés sikerrel jártak. Valójában, amint azt az előzőekben említettük, a befogott térfogat gyakran csökken, ha a hordozó fázisban nagy az oldott anyag koncentrációja, ami azt jelzi hogy a befogandó anyag nagy koncentrációjának káros hatása van a befogott térfogatra. Például SZOKA és munkatársai (lásd a fenti hivatkozást) azt ismertették, hogy citozin-arabinozid befogása progresszíven csökken a hordozó folyadék növekvő nátrium-klorid koncentrációjával. Hasonló helyzetet ismertetnek a WO-A-89/11272 közzétételi számú európai szabadalmi leírásban, miszerint a cefalosporin befogásában drasztikus csökkenés következik be a gyógyszer koncentrációjának a hordozó folyadékban való növekedésével.

Egy másik, a liposzómáknak idegen, nem-lipid anyagokkal való megtöltésére szolgáló eljárás szerint olyan körülményeket létesítenek, amelyek mellett az anyag be tud hatolni a falakon keresztül a hólyagocska magjába, ezt az eljárást "transzmembrán töltés"-nek nevezik, az eljárás szerint a kapszulázandó anyagot a liposzóma hólyagocskákba azután viszik be, hogy a hólyagocskákat megformálták. Szokásosan nehézséget jelent, hogy a lipid

membránon az idegen anyagok (főként ionosak) áthatoljanak, mivel a bejutó anyagokat a lipidek poláris csoportjai távol-tartják. Ez a hatás azonban minimálisra csökkenthető, ha "pajzs" hordozókat építünk be a lipid membránba. Például a liposzómák megtölthetők kationokkal szobahőmérsékleten, ha a lipid membrán lipofil hordozóanyagot, például acetil-acetont tartalmaz [BEAUMIER és munkatársai, J. Nucl. Med. 32, 810 (1982)]. Más módon az idegen anyagok bevihetők a liposzómákba ozmotikusan szabályozott permeációval a lipid membrán falon át. Például az idegen anyagoknak a liposzómák által való fel-vétele elősegíthető egy transzmembrán ion-gradiens alkalmazá-sával, például  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  gradiens alkalmazásával, amint azt a J. Biol. Chem. 260 802-808 (1985) ismertetik. Hatásos a membránon át való töltés megvalósításához a pH-gradiens is, amint azt a Biochim. Biophys. Acta 857, 123-126 (1986) szakiro-dalmi helyen, a WO-A-89/04656 közzétételi számú európai szaba-dalmi leírásban és a PCT/US85/01501 számú szabadalmi leírásban ismertetik. Azonban ezek az eljárások a hatóanyagoknak bizonyos speciális köreire korlátozottak, különösen gyenge bázisokra, amint azt a Chem. Phys. Lipides 53, 37 (1990) szak-irodalmi helyen ismertetik. Továbbá nehéz liposzómákat készíteni olyan hordozó fázisban, amelynek pH-ja eltér a mag-fázisétól, és, ezen kívül, a túl alacsony vagy túl magas pH a lipidek túl korai hidrolízise folytán a membrán károsodásához vezethet.

A 361 849 A számú európai szabadalmi leírásban olyan eljárást ismertetnek, amelyben amfipatiás hatóanyagokat töltenek liposzóma hólyagocskákba transzmembrán bevitellel

utólag létrehozott pH gradiens szabályozásával. Ennek az eljárásnak a fő jellemzője az ammónia leszakadásában áll, amely az ammónium vegyület vizes oldatával megtöltött liposzóma hólyagocskák magjáról szakad le, és az ammónium-mentes hordozóanyagba jut. Az ammónia ( $\text{NH}_3$ ) leszakadása az  $\text{NH}_4^+$  ionról egy protont eredményez, minek folytán a befogott folyadék pH-ja csökken, és ennek következtében egy pH gradiens jön létre a liposzóma membránon át, azaz a hordozó folyadék lúgossá válik a liposzóma magon belüli tartalomhoz viszonyítva. Ha egy amfipatiás vegyületet (például egy deprotonált amincsoportot) adunk a "lúgosított" hordozó folyadékhoz, a rendszer egyensúlyba jutásra törekszik, és az említett amfipatiás vegyület diffúziója következik be a liposzóma magjába a lipid membránon át.

A dehidratált és rehidratált liposzómák transzmembrán töltésére vonatkozó eljárások is léteznek. A 4 673 567 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban "üres" MLV liposzómák előállítását ismertetik ionmentes vizes hordozóanyagban, és ezen liposzómák liofilizéssel történő dehidratálását írják le; majd a szárított liposzómákat olyan gyógyszereket, tartalmazó folyékony hordozóanyagban végzett szuszpendálással rehidratálják, mint például a Fluorouracil és a Cefalexin, és  $50^\circ\text{C}$  hőmérsékleten 5 percig való melegítéssel inkubálják. Ezalatt a hordozóanyagban oldott hatóanyag jelentős része a liposzómákba befogódik. Ennek a megközelítésnek a háttérében az a gondolatmenet áll, hogy a "liposzómák fagyasztva-szárítása a kétrétegű membránban szerkezeti hiányosságokat hoz létre, és hogy az átmeneti hőmérséklet fölé történő melegítés eltávolítja ezeket a

hiányosságokat"; ilyen ismertetés szerepel a H. JIZOMOTO és munkatársai, Chem. Pharm. Bull. 37, 3066-3069 (1989) szakirodalmi helyen. Azonban, amint azt a 4 673 567 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik, ez az eljárás a befogott térfogat jelentős csökkenésével jár, ha a hordozó folyadék ionos oldott anyagokat tartalmaz. Például a fenti szakirodalmi hely 1. táblázatának 3. oszlopában felsorolt adatokból, ahol izotóniás sóoldat vagy 0,02 foszfátpuffer hordozóanyagként való alkalmazását írják le, a transzmembrán hatóanyagfelvétel gyakorlatilag elhanyagolható, míg ha a hatóanyagot tiszta vízben oldják, a befogott térfogat 16,6  $\mu\text{l}/\text{mg}$  lipid. Továbbá, figyelembe kell venni, hogy a jelenlegi gyakorlatban nem könnyen érhető el nagy befogott térfogat érték. Például T. D. MADDEN és munkatársai [Chemistry and Physics of Lipids 53, 37-46 (1990) "The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient" című munkájában ismertetettek szerint a befogott térfogat nem haladja meg az 1 - 2  $\mu\text{l}/\text{mg}$  foszfatidil-kolin értéket.

Az előzőekben ismertetett rövid összegzésből látható, hogy a technika állása szerint a liposzómák töltésére szolgáló eljárások bonyolultak, költségesek, és nem általánosan használhatók minden típusú hatóanyag és anyag liposzómákba való bevitelére, nevezetesen az ionos anyagokat általában nehéz befogni. Ezért célul tűztük ki, hogy a befogott térfogatot jelentősen növeljük, de ugyanakkor elkerüljük a filmképző lipidek hosszadalmas és költséges előkezelését (például a liofilezést, amint azt H. JIZOMOTO [Chem. Pharm. Bull. 37, 1895-1898 (1989) ismertetik, és egyidejűleg hatékony körülményeket

teremtsünk arra, hogy a membránképző lipidek transzmembrán töltési kapacitását lényegében minden fajta vizes közegben oldott anyagra nézve, beleértve az ionos anyagokat is, fokozzuk. Ezt a célt egy ozmotikusan szabályozott permeációs eljárással érjük el.

Röviden ismertetve a találmány szerinti eljárást, úgy járunk el, hogy bármely ismert eljárással liposzómákat készítünk, az elkészített liposzómák "üresek". Az "üres" liposzóma kifejezéssel azt kívánjuk mondani, hogy a benne befogott vizes fázis csak tiszta víz, vagy más esetben igen híg oldat, amely nemionos anyagokat vagy elektrolitokat tartalmaz. Általában szólva, ha a frissen készített "üres" liposzómákban befogott fázisban oldott anyag van jelen, annak ozmolalitása nem haladhatja meg a mintegy 0,2 Osm/kg értéket; ha az oldatok elektrolitek, a befogott folyadék ionerőssége nem haladhatja meg a 0,1 értéket. Ha már elkészítettük az úgynevezett "üres" liposzómákat, ezeket olyan hordozó folyadékban szuszpendáljuk, amely egy vagy több kapszulázandó anyagot tartalmaz, és a rendszert az átmeneti hőmérséklet ( $T_C$ ) fölötti értéken inkubáljuk annyi ideig, hogy biztosítsuk a hólyagocskák transzmembrán permeációval való megtöltését.

Itt kell hangsúlyoznunk, hogy a találmány egyik fő szempontja a kezdetben elkészített liposzómákban jelenlévő vizes fázisban az oldott anyag hiánya vagy igen csekély mennyisége, különösen igaz ez akkor, ha az oldott anyagok elektrolitok. Ebben az összefüggésben meg kell jegyeznünk, hogy a liposzóma hólyagocskák "minősége", azaz az a képességük, hogy olyan magas befogott térfogatot vesznek fel, amelyet csak

lehetséges, erősen függ ennek a vizes folyékony fázisnak az ionerősségétől, természetesen ez a vizes fázis az, amelyik befogódik a képződő "üres" liposzómák magjába a liposzómák képződésének idején. Ez a helyzet erős ellentmondásban van a technika állása szerinti kitanítással (lásd a 4 673 567 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban), ahol a befogott térfogatot csak a liposzóma hólyagocskákon kívül lévő ionokkal hozzák kapcsolatba, azaz azokkal az ionokkal, amelyek abban a hordozó folyadékban vannak jelen, amelyben a liposzómákat a dehidratálás után inkubálják. Ennek folytán a találmány azon az alapvető váratlan felismerésen alapszik, hogy a frissen készült liposzómák membránjának átmeneti-permeabilitása főként attól a folyadéktól függ, amelyben az "üres" liposzómák eredetileg készültek, nem attól a folyadéktól, amelyet a poszt-inkubációs kezelésre használnak. Valójában fordított kapcsolat van az üres liposzómák készítésére használt folyadékban lévő elektrolit-koncentráció és a későbbiekben kapszulázandó idegen anyag befogott térfogata között. Minél hígabb az előbbi folyadék, annál nagyobb a befogott térfogat.

Például a találmány egyik megvalósítási formája szerint membránképző lipideket elegyítünk vizes folyékony hordozóanyaggal, például pH = 1-12 értékű vízzel, de előnyösen semleges körüli pH-jú vízzel, amely adott esetben hígított pufferokat és/vagy nemionos stabilizálóanyagokat, például cukrokat vagy más poliolokat tartalmaz, és a hordozóanyagokat egy időtartamon át néhány fokkal a hidratált lipid kristály/folyadék átmeneti hőmérséklete ( $T_c$ ) fölött tartjuk, ez előnyösen egy keskeny hőmérséklet-tartomány értéken belül esik. Ennek a

tartománynak a szélessége mintegy 20 °C, a legelőnyösebb hőmérséklet ennek a tartománynak a közepe táján van, azaz mintegy 4 - 10 °C értékkel a  $T_C$  érték fölött. A hatékony hidratálás megvalósításához és a lipidek kondicionálásához szükséges idő annak az időnek felel meg, amelyik ahhoz szükséges, hogy ezen anyagokból homogén oldatot vagy diszperziót nyerjünk a hordozó fázisban, adott esetben keveréssel. Általában a folyadék gyenge forgatása elegendő a homogenitás biztosításához, de kívánt esetben lehetséges erősebb keverés végzése is. Megjegyezzük, hogy a hidratálás és a lipidek kondicionálása során képződő liposzómák átlagos mérete függhet a keverés sebességétől és módjától. Általában az igen lassú keverés esetén a liposzómák nagyobb átlagos méretűek, és nagyobb belső kapacitásúak, mint ha erőteljesebb keverést alkalmazunk. Azt is meg kell jegyeznünk, hogy a lipidek minden olyan előzetes kezelése, amelyeket a szakirodalomban a liposzómák töltési kapacitásának növelésére javasoltak, azaz a fagyasztva-szárítás, olvasztás, oldatból való bepárlás vékony filmmé laboratóriumi lombik oldalain, és hasonló előkezelések, ártalmatlanok ugyan, de a találmány szerinti eljárásban teljesen fölöslegesek, azonban, mivel ezek az előkezelések nem károsak, kívánt esetben alkalmazhatók.

Az ionosan töltött komponensektől eltekintve, a lipidek vagy lipid-elegyek, amelyeket a találmány szerint alkalmazunk, lényegében magukban foglalják mindazokat a vegyületeket, amelyeket a liposzómák területén szokásosan alkalmaznak, azaz a glicerofoszfolipideket, nem-foszforilált glicerideket, glikolipideket, szterineket és más olyan adalékokat, amelyek a lipo-

szóma membránoknak módosított tulajdonságokat kölcsönöznek. Előnyösen legalább egy polarizálható komponenst tartalmaznak (akár csak kis mennyiségben is), nevezetesen egy kationos vagy anionos funkciót hordozó lipidet, vagy egy ionizálható tenzidet, például egy zsíralkohol-difoszfát-észtert, például dicetil-foszfátot (DCP) vagy egy magasabb szénatomszámú alkil-amint, például sztearil-amint (SA). A töltött foszfolipidek, azaz zsírsav glicerid foszfatidok, például a foszfatidinsav (PA), foszfatidil-glicerin (PG), foszfatidil-inozit (PI), foszfatidil-szerin (PS), amelyek természetes forrásból származóak vagy szintetikusak lehetnek [például a dipalmitoil-foszfatidinsav (DPPA), dipalmitoil-foszfatidil-glicerin (DPPG), stb.] megfelelő polarizálható lipid komponensek. A glicerofoszfolipidek közé tartozhatnak például a következő szintetikus vegyületek: dipalmitoil-foszfatidil-kolin (DPPC), dipalmitoil-foszfatidil-etanol-amin (DPPE) és a megfelelő disztearoil- és dimirisztill-foszfatidil-kolin és -etanol-amin (DSPC; DSPE; DMPC és DMPE). A foszfolipidek közé tartozhatnak olyan természetes foszfolipidek is, amelyeket többé vagy kevésbé kimerítő hidrogénezésnek tettek ki, például a tojás és szója foszfatidil-kolin.

A glikolipidek lehetnek mono-, di- és trihexozidokkal származékká alakított cerebrozidok, galaktocerebrozidok, glükocerebrozidok, sfingomielinek, szulfatidok és sfingolipidek. A szterineket takarékosan kell használni, mivel túlságosan hátráltathatják a membránpermeációt, ezek körébe tartozik például a koleszterin, az ergoszterin, a koprosztanin, a koleszterin-észterek, például a hemiszukcinát (CHS), tokoferol-

-észterek és hasonló vegyületek.

A találmány szerinti eljárást úgy hajtuk végre, hogy a lipidek vagy a lipidek elegyének megfelelő arányát adalékkal vagy anélkül belekeverjük egy adott térfogatú nemionos vizes folyadékba (vagy egy olyan vizes folyadékba, amelynek ion-erőssége nem haladja meg a 0,1 értéket, és ozmolalizása nem lépi túl a 0,2 Osm/kg értéket), és a lipidek hidratálódását annyi ideig hagyjuk végbemenni, míg az elegy homogénné válik, erre az időre a kívánt liposzóma hólyagocskák kialakulnak. Amennyiben a folyékony fázis lényegében víz, a lipidek viszonylagos aránya a vizes folyadékhoz nem kritikus, de nyilvánvaló, hogy egy minimális mennyiségű folyadék szükséges ahhoz, hogy benne a lipideket jól lehessen diszpergálni. Szokásosan 1 tömegrész lipidre vagy lipid-elegyre és membránképző adalékra legalább 20 rész folyékony fázist alkalmazunk. Kiváló eredmények érhetők azonban el kisebb lipid: folyadék tömegarány mellett, például 0,1 - 1 % nagyságrend esetén. Ha az üres liposzómák készítéséhez alkalmazott vizes fázist ezután hordozóanyag fázisként alkalmazzuk az inkubálásnál (azaz a kapszulázandó anyagot egyszerűen hozzáadjuk ahhoz a folyadékhoz, amelyben a liposzómákat készítettük), nyilvánvalóan előnyös, hogy ha a folyadék lipidre vonatkoztatott mennyisége nem túl nagy, mivel ez a kapszulázandó anyag fölösleges hígításához vezetne, és alacsonyabb kapszulázási hozamot eredményezne. Ha azonban a liposzóma diszperzió túl híg, a hólyagocskák koncentrációja centrifugálással ( $10^3$  -  $10^5$  g tartományban), vagy a folyadék részleges bepárlásával vagy megfelelően kalibrált szemipermeabilis membránokon való ultraszűrésével a megfelelő

értékre hozható.

Miután a lipideket hozzáadtuk a folyékony fázishoz, a rendszert alkalmankénti összerázás mellett állással hagyjuk homogenizálódni, vagy ennél állandóbb keverést végzünk. Ennek a műveletnek a hőmérsékletét az előzőekben már ismertettük. A folyadék felmelegíthető a kívánt hőmérsékletre a lipidek adagolása előtt vagy után. Az előnyös hőmérséklet természetesen az alkalmazott lipid vagy lipidkeverék típusától függ, azonban a leggyakrabban alkalmazott lipidek és lipidkeverékek esetén a hidratálás és a homogenizálás hőmérsékletét a 40 - 80 °C tartományba állítjuk be.

Rendkívül sok olyan összetételű folyadékfázis létezik, amelyben a találmány szerint a liposzóma hólyagocskák létrehozhatók. A tiszta víz mellett a híg elektrolitok például ásványi sók oldatai vagy a nemionos anyagok, például glikol vagy poliol stabilizátorok alkalmazhatók. Példaként említjük a következő nemionos stabilizátorokat: cukrok, például szacharóz, glükóz, laktóz és maltóz, poliolo, például glikolok, glicerín, szorbit, mannit, polietilén-glikol, dextrán és xantán.

Az az időtartam, amely ahhoz szükséges, hogy a lipidek kiváló kapszulázó tulajdonságokkal bíró liposzóma hólyagocskákká hidratálódjanak és kondicionálódjanak, néhány perc és néhány óra között változhat a kívánt hőmérsékleten, de általában előnyös a 30 - 60 percnél nem hosszabb melegítési idő.

Természetesen a találmány szerinti eljárás körébe tartoznak olyan, a lipidek és a vizes hordozóanyag kezdeti érintkezésbe hozására szolgáló feltételek, amelyek eltérnek a

komponensek egyszerű egymással való elegyítésétől. Például, amint azt az előbb említettük, a liposzómák előállításának más útjai is alkalmazhatók, például először képezhető egy felületen egy lipid film (például egy gömblombikon vagy üveggyöngyökön vagy egy köteg drótszerű anyag hézagterfogatának felületén), majd a vizes fázis érintkezésbe hozható vagy cirkuláltatható az előbbi lipid filmmel addig, míg az utóbbi hidratálása hatékonyan bekövetkezik. Kívánt esetben a hidratálás ultrahanggal is segíthető. Megfigyeltük azonban, hogy a találmány szerinti legegyszerűbb eljárás vezet a legnagyobb befogó kapacitású liposzómák létrejöttéhez.

A találmány szerint nyert liposzóma hólyagocskák általában mintegy 80 nm és mintegy 5  $\mu$ m közötti méretűek, ha terápiás vagy diagnosztikai alkalmazásra injektálással kívánjuk használni, a 300 - 2000 nm méret közelében lévők az előnyösek. Ezek a liposzómák általában MLV típusúak, de más típusú liposzómák is készíthetők a műveleti paraméterek megválasztásától függően. A liposzómák méret szerinti megoszlása általában igen tág, de ha szűkebb méreteloszlást kívánunk, kalibrációs eljárások, például mikroporózus membránon való extrudálás vagy nyomás alatti szűrés sikeresen alkalmazható. Ebben az összefüggésben megjegyezzük, hogy az üres liposzómák kalibrálása előnyös a töltött liposzómákéval szemben, mivel a liposzómákban még nincs befogott anyag, nem történhet az extrudálás során hasadás rajtuk. Az üres liposzómák extrudálása könnyű, mivel belső viszkozitásuk alacsony. Ezért az extrudálást előnyösen a  $T_c$  alatti hőmérsékleten, például szobahőmérsékleten vagy az alatt végezzük, ez az ezt követő transzmembrán töltési lépésben optimális

befogási hozamot (nagy befogott térfogatot) eredményez.

Továbbá, a találmány szerint az üres liposzómák típusa, mérete és koncentrációja az inkubálás előtt a szükségletekhez alkalmazható, a befogott anyagban ebben a műveletben nincs veszteség.

A találmány szerinti liposzómák alapvető előnye azonban abban áll, hogy meglepően nagy töltési lehetőséggel bírnak a kapszulázandó idegen anyagok iránt. Ez a töltés könnyen végrehajtható a kapszulázandó anyagnak egyszerűen abba a folyadékba való bevitelével, amelyben a liposzómát készítettük, vagy más folyadék hordozóba való bevitelével, amelyben ezt követően az üres liposzómákat szuszpendáljuk, ez a folyadék szolgál hordozóul a kapszulázandó anyaggal való inkubálásnál. A kapszulázandó anyagot vagy tisztán, vagy oldata formájában alkalmazzuk. Ezt követően a rendszert egy időtartamon át a lipid  $T_c$  átmeneti hőmérsékleténél magasabb hőmérsékleten inkubáljuk. Ha a kapszulázandó anyagot tisztán használjuk, ez először a hordozóanyagként szolgáló folyadékban oldódik, és abból a membránon való permeációval át hatol be a liposzóma magba. Hasonló eljárás következik be, ha idegen anyagot oldatként adunk be, itt az inkubáló hordozó folyadék először hígul a bevitt oldattal, és az oldott anyag fog behatolni a liposzómába az előzőekben említett módon. Különösen jelentős annak megemlítése - a technika állásával szemben -, hogy a találmány szerinti hólyagocska transzmembrán töltési mechanizmusa kielégítően megtörténik akkor is, ha az inkubálásra alkalmazott hordozó folyadékban ionok vannak jelen, ezek az ionok lehetnek az inkubációs hordozóanyag saját összetevői (pufferek vagy sóoldat), vagy a kapszulázás szempontjából szóba jövő

anyagok. Úgy tűnik, hogy ha a liposzóma hólyagocskákban először befogott víz tiszta vagy alacsony koncentrációban tartalmazza az anyagokat, a technika állásából korábban ismert permeáció gátlás leküzdhető. Ami a találmányban különösen meglepő, az az, hogy ha az inkubálás során egy ionos anyag egy része már behatolt, ez nem gátolja a folyékony hordozóanyagban még megmaradt rész behatolását.

Az inkubálás időtartama változó a lipidbe való permeáció sebességének függvényében, amely a kapszulázandó anyagra jellemző; a hordozó fázisban lévő liposzómák koncentrációjától és természetétől függően; valamint befolyásolja az inkubálás hőmérséklete is. Az inkubálási idő végpontját általában meghatározó tényező az az állapot, amikor a kapszulázott anyag koncentrációja azonos a liposzómán belül és kívül. Ekkor, mivel az egyensúly beállt, az inkubálás folytatásának nincs további célja. Természetesen a magasabb hőmérsékletek esetén az egyensúly hamarabb beáll, azonban a túl magas hőmérsékletek károsak lehetnek a liposzómák jellemzőire, nevezetesen a fajlagos kapszulázási kapacitásra, azaz a magtérfogat arányára a lipid tömegéhez, ennek folytán az inkubálás hőmérséklete mintegy a  $T_c$  hőmérséklet és 150 - 200 °C közötti, az előnyös tartomány 40 - 130 °C. Ebben az összefüggésben megjegyezzük, hogy ha az inkubáció hőmérséklete a megadott tartomány magasab részébe esik, például 100 - 150 °C, az inkubálással egyidőben a liposzómák lényegében sterilizálódnak is. Más megoldás szerint a sterilizálás és az inkubálás egymástól függetlenül és egymást követően is végrehajthatók. Azok a melegítési módszerek, amelyekkel a liposzómákat és a kapszulázandó termékeket az inkubálás hőmérsék-

letére melegítjük, a szakterületen szokásosak, természetesen magukban foglalják a mikrohullámú melegítési módokat is. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a lipideknek a liposzóma képzéshez alkalmazott kezdeti hidratálásánál és kondicionálásánál alkalmazott hőmérséklet nem cserélendő össze az inkubálás hőmérsékletével, bár bizonyos megvalósítási módoknál a két hőmérséklet azonos lehet. Valójában a hidratálási hőmérséklettartomány jóval szűkebb, mint az inkubálási hőmérséklettartomány. Ha a hidratálást és kondicionálást egy adott tartományon kívül végeznénk, például mintegy 80 °C hőmérsékleten olyan lipidekkel vagy lipid-keverékekkel, amelyeknek  $T_C$  értéke 45 - 55 °C, rosszabb minőségű liposzómákat nyernénk, azaz a liposzómák befogókapacitása csökkenne, és a befogott térfogat a tömegarányhoz képest alacsonyabb lenne.

Megjegyezzük, hogy a találmány egy további előnye az, hogy az inkubáláshoz használt vizes hordozóanyagban lévő lipid-koncentrációnak nincs jelentős hatása a liposzómák befogási kapacitására és a vizes hordozóanyagba adagolt idegen anyagok iránti hatékonyságára. Mivel a liposzómáknak a vizes hordozóanyagban való töményítésével, azaz a lipidnek a hordozóhoz viszonyított tömegarányának növelésével kedvezően befolyásolható a befogási hozam, csökkenthető a be nem fogott, visszanyerendő, újra felhasználandó maradék anyag mennyisége. Ez illusztrálható azzal, hogy az idegen anyag liposzóma magban lévő végső koncentrációja csak az adott anyagnak az inkubáló hordozó folyadékban való kezdeti koncentrációjától függ, nem a kapszulázásra alkalmazott idegen anyag teljes tömegétől. A fentiek következtében a felhasznált össz-mennyiség egy adott koncentráció esetén

csökkenthető az inkubálásra alkalmazott folyadék mennyiségének csökkentésével, illetve fordítva, a lipidek hordozó fázisban való koncentrációjának növelésével megnövekedett befogási hozam érhető el.

A találmány szerint a liposzómákba befogandó anyag bármely elképzelhető terápiás vagy diagnosztikai szempontból aktív anyag lehet. Ezek között említhetjük például az olyan hatóanyagokat, mint az analgetikumok, narkotikumok, antibiotikumok, szulfamidok, szteroidok, Rtg-sugár kontrasztanyagok, NMR kontrasztanyagok és olyan vegyületek, mint például az N,N'-bisz[2-hidroxi-1-(hidroxi-metil)-etil]-5-[(2-hidroxi-1-oxo-propil)-amino]-2,4,6-trijód-1,3-benzoldikarboxamid (jopamidol); metrizamid; diatrizoinsav; nátrium-diatrizoát; meglumin-diatrizoát; acetrizoinsav és oldható sói; diprotrizoinsav; jódamid; nátrium-jodipamid; meglumin-dijopamid; jód-hippursav és oldható sói; jód-metaminsav; jód-piracetido-2-piridon-N-ecetsav; 3,5-dijód-4-piridon-N-ecetsav (jodopiracet) és dietil-ammónium-sója; jotalminsav; metrizoinsav és sói; ipanoin-, iocetamin- és iofenoxinsav és sóik; nátrium-tiropanoát; nátrium-opidát és más hasonló jódzott vegyületek.

A következőkben a találmányt példákban mutatjuk be.

#### 1. Példa

30 g foszfolipid [(9/1 mólarányú hidrogénezett szója-lecitin (Phospholipon 100H a NATTERMANN-PHOSPHOLIPID GmbH, Köln, Németország) és dipalmitoil-foszfátidinsav-dinátrium-só (DPPA)] és nyomnyi mennyiségű  $^{14}\text{C}$  jelzett tripalmitin (Amersham) 250 ml kloroformban készült oldatát 10 literes reagáltató

lombikba visszük. A kloroform vákuumban végzett lepárlása után a visszamaradó anyaghoz 6 liter desztillált vizet adunk 55-60 °C hőmérsékleten (az alkalmazott hidratált lipidek átmeneti hőmérséklete differenciál scanning kalorimetriás módszerrel meghatározva 54 °C), és a szilárd lipideket hagyjuk hidratálódni, és a folyadéokban homogénan eloszlan, miközben időnként enyhén összerázzuk, ezáltal az MLV típusú liposzómák képződnek magas hozammal. Mintegy 1 óra után az 5 mg/ml lipidet tartalmazó liposzóma szuszpenziót 60 °C hőmérsékleten 2 µm-es polikarbonát membránon (Nucleopore) extrudáljuk, és szobahőmérsékleten való lehűtés után mikroszűréssel, 0,22 µm-es mikroszűrőt (Millipore) alkalmazva 30 mg/ml koncentrációra sűrítjük.

A koncentrált liposzóma oldathoz 1 liter vizes oldatot adunk, amely 1040 g (S)-N,N'-bisz[2-hidroxi-1-(hidroxi-metil)-etil]-2,4,6-trijód-5-laktamido-izoftálamidot tartalmaz (jopamidol, egy Rtg-sugár kontrasztanyag, amelyet a BRACCO INDUSTRIA CHIMICA, Milánó gyárt), azaz 520 g/l kovalens jódot alkalmazunk 60 °C hőmérsékleten. A kapott 2 liter elegy jód-koncentrációja 260 g/l, az elegyet mintegy 30 percig 60 °C hőmérsékleten inkubáljuk, ez idő alatt a liposzóma magban és azon kívül a jódkoncentráció kiegyenlítődik. A kapott készítményt 30 g lipid/l koncentrációra töményítjük (A preparátum).

Az A preparátumot elemezzük lipidtartalma és a kapszulázott jódtartalom szempontjából. Ezt úgy végezzük, hogy 1 ml alikvot részt dializálunk sóoldattal szemben (0,9 %-os vizes NaCl), míg a liposzóma hólyagocskákon kívüli minden jopamidot eltávolítunk (mintegy 24 óra a dialízis közeg négyszeri cseréjével). A mintát ezután 50 °C hőmérsékleten térfogatának 1/10-

ét kitevő 10 %-os vizes nátrium-dodecil-szulfát-oldattal kezeljük, és a felszabadult jopamidolt spektrofotometriásan 260 nm-nél mérjük. A lipidek megfelelő mennyiségét szcintillációs számlálóval való méréssel határozzuk meg, a tripalmitin nyomanyag maradék radioaktivitása alapján. Az előzőekben ismertett elemzés eredményei szerint a jód/lipid arány (J/L) formájában mért kapszulázó kapacitás következetesen 3 - 5 mg (vagy több) befogott jód/mg lipid, ami azt jelenti, hogy a liposzóma hólyagocskák által átlagosan befogott belső térfogat (260 mg/ml jódkoncentráció alapján számítva) mintegy 12-19  $\mu$ l/mg lipid (vagy több).

Az e példa szerint előállított, kontrasztanyaggal töltött liposzóma A preparátum egy részét 0,22  $\mu$ m-es membrán (Millipore) alkalmazásával 0,9 mmól/l  $\text{Na}_2\text{Ca}$  EDTA-t tartalmazó puffertolt sóoldattal (0,9 % NaCl, 10 mmól trisz.HCl, pH = 7,2) szemben diafiltráljuk. A kapott preparátum (B preparátum), valamint az A preparátum közvetlenül használható a kísérleti állatok véráramába való injektálással, mindkettő igen kedvező eredménnyel biztosítja a véredényekben és szervekben (például máj és lép) a Rtg-sugár kontrasztanyagként való hatást.

Ha az előbbi példában jopamidol helyett iomeprol [N,N'-bis(2,3-dihidroxi-propil)-2,4,6-trijód-5-glikolamid-izoftálimid] alkalmazunk, amely egy másik jódozott kontrasztanyag, a BRACCO INDUSTRIA CHIMICA (Milánó) terméke, hasonló befogási eredményeket tapasztalunk. Ha az előző példában az iopamidolt B17500-val helyettesítjük, amely a BRACCO kísérleti nemionos dimerje, 6 feletti J/L értékeket, esetenként 7 feletti J/L értékeket nyerünk. Hasonló eredményeket tapasztaltunk iotrolan,

egy nemionos dimer alkalmazásával (a SCHERING AG terméke).

## 2. Példa

REV liposzómákat állítunk elő Szoka és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4194 (1978)] eljárásával. Az eljárás röviden a következő: 912,2 mg hidrogénezett szójalecitint (Phospholipon 90H, a NATTERMANN PHOSPHOLIPID GmbH terméke) és 92,9 mg DPPA-t 80 ml 1:1 arányú kloroform:izopropil-éter elegyben oldunk. Az oldathoz 30 ml desztillált vizet adunk, és az elegyet 5 x 1 perces ultrahangos kezeléssel emulgeáljuk, Branson ultrahang berendezést alkalmazunk, miközben az elegy hőmérsékletét 45 °C hőmérsékleten tartjuk. Ezután az emulziót 45 °C hőmérsékleten, vákuumban, rotációs bepárlón bepároljuk. A maradék oldószer teljes eltávolítása után kevés desztillált vizet adunk a visszamaradó anyaghoz, így a REV liposzómák 33 mg lipid/ml-es szuszpenzióját nyerjük, a liposzómák átlagos mérete 0,4  $\mu$ m. 1,4 g iopamidolt 2 ml fenti szuszpenzióban oldunk, és az oldatot 1 órán át 80 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A kapott J/L érték 2,1 és 2,3 közötti (az 1. példában leírt módon mérve).

Alacsonyabb befogású hozamokat érünk el, ha összehasonlítás kedvéért iopamidol oldatot (30 ml, 260 mg jód/ml) alkalmazunk tiszta víz helyett a lipid szerves oldószerben készült oldatával való kezdeti emulgeálásban.

Ezeket a vizsgálatokat megismételtük olyan REV liposzómákkal, amelyeket dipalmitoil-foszfátidil-kolin (DPPC) és dipalmitoil-foszfátidil-glicerín (DPPG) 9:1 molarányú elegyével, és vizes fázisként desztillált vízzel állítottunk elő, és az inkubálást nátrium-diatrizoáttal (215 vagy 21,5 mg jód/ml)

végeztük 60 °C hőmérsékleten 20 percig. Az összehasonlítás kedvéért REV liposzómákat készítettünk ugyanezekkel a foszfolipidekkel, kezdeti vizes fázisként nátrium-diatrizoát oldatok (215 és 21,5 mg jód/ml) alkalmazásával desztillált víz helyett. Bár a két különböző megoldásnál azonos nagyságrendű befogási hozamot nyertünk, azaz a J/L értékek mintegy 1, illetve 0,2 a 215, illetve 21,5 mg jód/ml mellett, az az eljárás, amelyet üres liposzómákkal kezdtünk, jobb eredményeket adott.

### 3. Példa

SUV típusú liposzómákat állítunk elő 60 °C hőmérsékleten 15 percen át végzett ultrahangos kezeléssel Branson ultrahangos berendezés segítségével, desztillált vízben az 1. példában leírt módon MLV liposzómákat készítünk. A 10 percig 10 000 g mellett végzett centrifugálás után nyert felülúszót jopamidollal (260 mg jód/ml végkoncentráció), 60 °C hőmérsékleten 20 percig inkubáljuk. 0,16 - 0,17 mg jód/mg lipid J/L értéket nyerünk (az 1. példa szerint mérve), ami 0,6 µl/mg lipid befogott térfogatnak felel meg.

### 4. Példa

MLV liposzómákat készítünk desztillált vízben az 1. példában leírt módon. A liposzóma szuszpenziót Mayer és munkatársai [Biochim. Biophys. Acta 817, 193 (1985)] eljárásával négyszer ismételten fagyasztjuk -75 °C hőmérsékleten, majd kiolvasztjuk 40 °C hőmérsékleten. Ebből a kezelt liposzóma szuszpenzióból egy részt extrudálunk (2 µm), és mind az extrudált, mind a nem-extrudált liposzóma szuszpenziókat 60 °C hőmérsékleten 30 percig jopamidol oldattal (260 mg jód/ml) inkubáljuk. Az extrudált liposzómákkal J/L = 5 értéket értünk el,

míg a nem extrudált liposzómákkal nyert J/L érték 6,3. Ha a fenti eljárás egy variációja szerint az extrudálást a lipidek átmeneti hőmérséklete alatt végezzük (például szobahőmérséklet és 50 °C között), jobb befogási hozamot érünk el (J/L = 8 vagy több).

### 5. Példa

A hőmérséklet hatása.

MLV liposzómákat készítünk desztillált vízben az 1. példában leírt módon, különböző hőmérsékleteken, azaz 55, 60, 65, 70 és 80 °C hőmérsékleten. A liposzómákat jopamidollal (260 mg jód/ml végső koncentráció) 60 °C hőmérsékleten 30 percig inkubáljuk. Az alábbi táblázatban közölt J/L értékeket nyerjük:

| Liposzóma képződés       | J/L                    |
|--------------------------|------------------------|
| <u>hőmérséklete (°C)</u> | <u>mg jód/mg lipid</u> |
| 55                       | 4,2                    |
| 60                       | 4,9                    |
| 65                       | 4,5                    |
| 70                       | 3,8                    |
| 80                       | 3,1                    |

Látható, hogy a liposzóma képződés optimális hőmérséklete 60 °C, azaz 6 °C hőmérséklettel az alkalmazott lipid-elegy átmeneti hőmérséklete fölött (Phospholipon 100H és DPPA 9:1 mólarányban).

Az inkubációs hőmérséklet hatását a következő módon határozzuk meg: MLV liposzómákat készítünk desztillált vízben 60 °C hőmérsékleten az 1. példában leírt módon. Ennek aliquot részeit különböző hőmérsékleten jopamidol oldattal (260 mg

jód/ml végső koncentráció) inkubáljuk. Ezt követően az alábbi táblázatban szereplő J/L értékeket nyerjük:

| Az inkubálás<br>hőmérséklete (°C) | J/L<br>mg jód/mg lipid |
|-----------------------------------|------------------------|
| 40                                | 3,0                    |
| 50                                | 3,4                    |
| 55                                | 4,7                    |
| 60                                | 4,9                    |
| 65                                | 4,1                    |
| 80                                | 3,9                    |

Az inkubálás optimális hőmérséklete 55-60 °C, azaz 1 - 6 °C hőmérséklettel az alkalmazott lipid-keverék átmeneti hőmérséklete fölötti érték.

#### 6. Példa

MLV liposzómákat készítünk desztillált vízben 60 °C hőmérsékleten az 1. példában leírt módon, különböző lipid-koncentrációk alkalmazásával, majd a liposzómákat 30 percig 60 °C hőmérsékleten jopamidol-oldattal (260 mg jód/ml) inkubáljuk az 1. példában leírt módon. A minta alikvot részeit különböző, az alábbi táblázatban megjelölt időtartamokon át tartjuk 130 °C hőmérsékleten, majd gyorsan szobahőmérsékletre hűtjük. Így az alábbi J/L értékeket mérjük:

| Az inkubálás<br>tartama 130 °C-on (perc) | J/L<br>mg jód/mg lipid |
|------------------------------------------|------------------------|
| 1                                        | 3,9                    |
| 2                                        | 3,8                    |
| 4                                        | 3,8                    |
| 6                                        | 3,7                    |
| 8                                        | 3,8                    |
| 10                                       | 3,6                    |

Az a következtetés vonható le, hogy a találmány szerinti liposzómák nem változnak töltési kapacitásuk tekintetében, ha sterilizési hőmérsékleteknek tesszük ki őket.

#### 7. Példa

##### A lipidkoncentráció hatása

MLV liposzómákat készítünk 60 °C hőmérsékleten desztillált vízben, az 1. példában leírt módon különböző lipidkoncentrációk alkalmazásával. Ezután a liposzómákat jopamidol oldattal (260 mg jód/ml) inkubáljuk az 1. példában leírt módon. Az alábbi táblázatban közölt J/L értékeket nyerjük:

| Lipidkoncentráció<br>képződéskor (mg/ml) | J/L<br>mg jód/mg lipid |
|------------------------------------------|------------------------|
| 2,5                                      | 3,8                    |
| 5,0                                      | 3,6                    |
| 10,0                                     | 3,5                    |
| 25,0                                     | 2,3                    |
| 50,0                                     | 1,9                    |

A legjobb eredményeket a 2,5-10 mg/ml lipidkoncentrációnál nyerjük.

MLV liposzómákat készítünk desztillált vízben, 60 °C hőmérsékleten, 5 mg/ml lipidkoncentráció mellett. A liposzómákat bekonzentráljuk (5 és 35 mg lipid/ml közötti értékre), majd jopamidol oldattal (260 mg jód/ml) inkubáljuk az 1. példában leírt módon. A következő táblázatban szereplő J/L értékeket nyerjük ki:

| Lipidkoncentráció          | J/L             |
|----------------------------|-----------------|
| az inkubálás alatt (mg/ml) | mg jód/mg lipid |
| 5                          | 3,6             |
| 9                          | 3,8             |
| 14                         | 3,9             |
| 18                         | 4,0             |
| 25                         | 3,7             |
| 35                         | 3,7             |

Láthatóan a lipidkoncentrációnak a jopamidollal való inkubálás során nincs hatása a befogó kapacitásra.

#### 8. Példa

MLV liposzómákat készítünk desztillált vízben, 2 µm-es membránon extrudáljuk, majd 35 mg lipid/ml értékre koncentrálnuk az 1. példában leírt módon. A koncentrált liposzóma szuszpenzió 1 ml-es alikvot részeit (de az A preparátum esetén 3 ml-t) az alábbi oldatok 1 ml-es alikvot részeihez adjuk:

A preparátum: Gd-DTPA (117 mmól/l), amely nyomnyi mennyiségű <sup>153</sup>Gd-mal jelzett.

B preparátum: 4 %-os vizes lidokain HCl oldat nátrium-hidroxid-

dal pH = 7,2-re állítva.

C preparátum: nátrium-diatrizoát oldat (215 m jód/ml).

D preparátum: 10 mg/ml-es, desztillált vizes ciszplatin-oldat.

E preparátum: 20 mg/ml-es, pH=7,5-re állított inzulin-oldat.

Az inkubálást az A, B és C preparátumok esetén 80 °C, a D és E preparátumok esetén 60 °C hőmérsékleten végezzük 30 percig. A befogott vegyületeket dialízist követően radioaktív számlálással (A preparátum), nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással (B preparátum), spektrofotometriás eljárással (C preparátum), illetve atomabszorpciós eljárással (D preparátum) határozzuk meg. Az E preparátum esetén a be nem fogott inzulint oszlopkromatográfiás eljárással távolítjuk el DEAE-A-50 Sephadex oszlopon, és a befogott anyag mennyiségét fehérje elemzéssel (Lowry eljárásával) határozzuk meg. Az alábbi töltés, illetve befogott térfogat értékeket nyertük:

| Minta         | Töltés                            | Befogott térfogat         |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------|
| A preparátum: | 0,25 - 0,35 $\mu$ mól Gd/mg lipid | 8,5 - 12 $\mu$ l/mg lipid |
| B preparátum: | 0,35 $\mu$ mól lidokain/mg lipid  | 5 $\mu$ l/ml lipid        |
| C preparátum: | 0,8 mg jód/mg lipid               | 3,5 $\mu$ l/mg lipid      |
| D preparátum: | 5,9 $\mu$ g ciszplatin/mg lipid   | 1 $\mu$ l/mg lipid        |
| E preparátum: | 0,18 mg inzulin/mg lipid          | 18 $\mu$ l/mg lipid       |

Minden vizsgált terméknel magas befogott térfogatokat észleltünk. Az A preparátum elkészítését megismételtük a Gd-DTPA-t Gd-BOPTA meglumin sóval helyettesítve, amely utóbbi egy új MRI kontrasztanyag, amely a BRACCO fejlesztés alatt álló terméke (kódja: B-19030; képlete: 3-fenil-metoxi-2-N[2'-N'-(2"-

-N"-bisz-(karboxi-metil)-amino-etil}-N'-(karboxi-metil)-amino-etil}-N-(karboxi-metil)-amino-propionsav), és ezzel hasonló eredményeket nyertünk.

### 9. Példa

A lipid összetételének hatása

Különböző foszfolipid elegyeket vizsgáltunk sorozatban, a vizsgálatot az 1. példában leírt módon végezve. Az alábbi táblázatban szereplő J/L értékeket nyertük:

| Lipid kompozíció (mólarány)                                                   | J/L |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Phospholipon 100H/DPPA.Na <sub>2</sub> (9,9/0,1)                              | 3,0 |
| Phospholipon 100H/DPPA.Na <sub>2</sub> (9,5/0,5)                              | 3,7 |
| Phospholipon 100H/DPPA.Na <sub>2</sub> (9,25/0,75)                            | 4,2 |
| Phospholipon 100H/DPPA.Na <sub>2</sub> (9/1)                                  | 4,9 |
| Phospholipon 100H/DPPG (9/1)                                                  | 4,8 |
| Phospholipon 100H/koleszterin/DPPA.Na <sub>2</sub> (4,5/4,5/1) <sup>a</sup>   | 1,3 |
| Phospholipon 100H/koleszterin/DPPA.Na <sub>2</sub> (6,75/2,23/1) <sup>b</sup> | 2,2 |
| Phospholipon 100H                                                             | 1,4 |
| Phospholipon 100H/sztearil-amin (9/1)                                         | 1,7 |
| DPPC/DPPA.Na <sub>2</sub> (9/1) <sup>c</sup>                                  | 4,0 |
| DPPC/DMPC/DPPA.Na <sub>2</sub> (4,5/4,5/1) <sup>d</sup>                       | 3,6 |
| Phospholipon 100H/DCP.Na (9/1)                                                | 3,0 |
| Phospholipon 90H/DSPA.Na <sub>2</sub> (9/1)                                   |     |

Az alkalmazott rövidítések jelentése:

DPPG: dipalmitoil-foszfátidil-glicerín-nátriumsó

DPPC: dipalmitoil-foszfátidil-kolin

DMPC: dimirisztoil-foszfátidil-kolin

DCP.Na: dicetil-foszfát-nátriumsó

A liposzómákat az alábbi hőmérsékleteken állítottuk elő:

- a: 40 °C-on  
 b: 50 °C-on  
 c: 50 °C-on (azaz 6 °C hőmérséklettel a foszfolipid elegy átmeneti hőmérséklete fölötte).  
 d: 40 °C-on (azaz 4 °C értékkel az elegy átmeneti hőmérséklete fölötte).

# 10. Példa

MLV liposzómákat készítünk desztillált vízben, az 1. példában leírt módon. Extrudálás és besűrítés után a liposzómákat különböző jopamidol koncentrációkkal inkubáljuk, NaCl távollétében (A sorozat) vagy jelenlétében (B sorozat). A C sorozat esetén az MLV liposzómákat közvetlenül a jopamidol oldatban készítettük különböző koncentrációjú NaCl jelenlétében. A kapott J/L értékeket az alábbi táblázatban ismertetjük:

| Jopamidol konc.<br>(mg J <sub>2</sub> /ml) | NaCl<br>(mmól/l) | J/L<br>(mg J <sub>2</sub> /mg lipid) | befogott térfogat<br>(μl/mg) |
|--------------------------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <b>A sorozat</b>                           |                  |                                      |                              |
| 100                                        | 0                | 1,7                                  | 17                           |
| 200                                        | 0                | 2,8                                  | 14                           |
| 260                                        | 0                | 3,5                                  | 14                           |
| 300                                        | 0                | 4,0                                  | 13                           |
| 370                                        | 0                | 4,4                                  | 12                           |
| <b>B sorozat</b>                           |                  |                                      |                              |
| 215                                        | 56               | 2,1                                  | 10                           |
| 215                                        | 565              | 0,7                                  | 3                            |

| Jopamidol konc.<br>(mg J <sub>2</sub> /ml) | NaCl<br>(mmól/l) | J/L<br>(mg J <sub>2</sub> /mg lipid) | befogott térfogat<br>(μl/mg) |
|--------------------------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <hr/>                                      |                  |                                      |                              |
| C sorozat                                  |                  |                                      |                              |
| 215                                        | 56               | 1,8                                  | 8                            |
| 215                                        | 565              | 0,15                                 | 0,7                          |
| <hr/>                                      |                  |                                      |                              |

A táblázatból látható, hogy a jopamidol koncentráció növelése növelte a töltést, anélkül, hogy a befogott térfogatra nagyobb hatást gyakorolt volna (A sorozat). A só jelenléte csökkent a töltést is, és a befogott térfogatot is (B sorozat). Azonban minden esetben magasabb töltetet értünk el a találmány szerinti eljárás alkalmazásával a klasszikus MLV eljáráshoz viszonyítva (C sorozat).

#### 11. Példa

MLV liposzómákat készítünk különböző vizes oldatokban (desztillált víz helyett) 60 °C hőmérsékleten, ezután extrudálást és koncentrálnálást végzünk, majd a liposzómákat 30 percig 60 °C hőmérsékleten jopamidol oldattal (260 mg jód/ml) inkubáljuk (lásd az 1. példában). A következő J/L értékeket nyertük:

| Az MLV liposzómák létrehozásához alkalmazott közeg | J/L<br>(mg J <sub>2</sub> /mg lipid) |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Desztillált víz (referenciaként)                   | 4,2 - 4,4                            |
| 10 mmól/l Trisz/HCl pH 7,2, 0,9 mmól/l EDTA        | 2,9 - 3,1                            |
| 6 mmól/l NaCl                                      | 3,0 - 3,3                            |
| 56 mmól/l NaCl                                     | 2,2 - 2,4                            |
| 560 mmól/l NaCl                                    | 0,7 - 0,8                            |

| Az MLV liposzómák létrehozá-<br>sához alkalmazott közeg    | J/L<br>(mg J <sub>2</sub> /mg lipid) |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 146 mmól/l trehalóz                                        | 2,1 - 2,3                            |
| 274 mmól/l mannit                                          | 1,5 - 1,8                            |
| iomeprol oldat (260 mg jód/ml)<br>(jopamidolként számítva) | 0,7                                  |

Amint az a fenti vizsgálatból látható, a jopamidol befo-  
gásában minden olyan esetben csökkenés látható, amelyben a  
hólyagocskák már oldott anyagot tartalmazó közegben készültek.  
Az ionos anyagok, például a nátrium-klorid 0,1 ionerősség  
fölötti vagy a nem-elektrolitok 200 mOsm/kg fölötti értékben  
való használata különösen káros.

### Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás vizes hordozó folyadékban szuszpendált liposzóma hólyagocskák kapszulázandó anyaggal való töltésére, ahol a liposzóma hólyagocskák egy vizes folyadékfázissal töltött magból és ezt körülvevő egy vagy több filmképző komponensből, köztük lamelláris foszfolipidekből és adott esetben nem-foszfolipid amfipatiás vegyületekből álló membránból állnak, az eljárás során a kapszulázandó anyagot a hordozó folyadékba bevisszük, és abban homogénen eloszlatjuk, és olyan hőmérsékleten inkubáljuk, amely a membrán lipid  $T_C$  átmeneti hőmérsékletét meghaladja, és az inkubálást olyan időtartamon át végezzük, amely alatt a kapszulázandó anyag a hólyagocska magjába transzmembrán permeációval behatol, azzal jellemezve, hogy a hólyagocska belső mag fázisában található folyadékfázis ozmolalitását a töltés előtt legfeljebb 200 mOsm/kg értéken tartjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy olyan liposzómaképző lipid elegyet hozunk érintkezésbe egy vizes fázissal, amelyben legalább az egyik komponens ionosan töltött, és a fenti liposzómaképző lipid elegyet és a vizes fázist annyi ideig tartjuk érintkezésben, amely elegendő ahhoz, hogy a lipid hidratált és lamellarizált legyen, azzal jellemezve, hogy az érintkezésbe hozást egy olyan lépésben hajtjuk végre, amelyben a lipid elegy tömegének egy részét aprított formában vesszük be, és keveréssel vagy keverés nélkül legalább 20 rész fenti vizes fázisban eloszlatjuk, a folyadékfázis hőmérsékletét ezen művelet során olyan tartományban tartjuk, amely néhány °C értékkel meghaladja a lipid hidratált

formájának fenti  $T_C$  átmeneti hőmérsékletét, a művelet során olyan liposzóma hólyagocskák képződnek, amelyek nagy arányban befogva tartalmazzák a folyadék fázist, és fokozott transzmembrán töltési kapacitással bírnak.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a liposzóma hólyagocskák magját megtöltő vizes folyadék képezi a liposzóma szuszpendálására szolgáló vizes hordozó folyadékot is.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy ionos vagy nemionos anyagot kapszulázunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az inkubálást a liposzóma diszperzióinak a  $T_C$  érték és  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  közötti hőmérsékletre való melegítésével olyan időtartamon át végezzük, amely alatt a hordozó fázisban oldott anyag koncentrációja a liposzómán kívül és a liposzóma magján belül lényegében kiegyensúlyozottá válik.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a melegítést  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  fölött végezzük, annyi ideig, amely a liposzómák sterilizését biztosítja.

7. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a liposzómák belső magjába befogott térfogat aránya a liposzóma hólyagocskák falait kitevő lipidek tömegéhez legalább  $5\text{ }\mu\text{l/mg}$ .

8. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a lipideket a hordozó fázisban keverés mellett oszlatjuk el, az így nyert liposzóma hólyagocskák átlagos mérete fordítottan arányos a keverés mértékével.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a vizes oldat, amelyben a liposzómákat létrehozunk, tiszta víz, miáltal a képződött liposzómák csak vizet tartalmazó üres

liposzómák.

10. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a liposzómák belső magja által befogott térfogatot ismételt fagyasztási és olvasztási lépésekkel és/vagy dehidratálási és rehidratálási lépésekkel növeljük.

11. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a liposzóma diszperziót kalibrált porózus membránon átvezetve a hólyagocskák méreteloszlását homogenizáljuk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy kapszulázandó anyagként általában gyógyszereket és injekálható diagnosztikai reagenseket alkalmazunk.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kapszulázandó diagnosztikai reagens egy szerves jódozott Rtg-sugár kontrasztanyag, amelyet a liposzómába az inkubálás során olyan mértékben viszünk be, hogy a töltés mg jód/mg lipid (J/L) értékben kifejezett hatékonysága legalább 3.

A meghatalmazott:

*Valós*  
DANUBIA  
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.  
7. *Valós*