



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **303481**

(13) B1

(51) Int Cl<sup>6</sup> A 61 K 9/127

## Patentstyret

---

|                   |                                      |                                      |                            |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| (21) Søknadsnr    | 19915012                             | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | 04.04.1991, PCT/DE91/00294 |
| (22) Inng. dag    | 18.12.1991                           | (85) Videreføringsdag                | 18.12.1991                 |
| (24) Løpedag      | 04.04.1991                           | (30) Prioritet                       | 24.04.1990, DE, 4013580    |
| (41) Alm. tilgj.  | 18.12.1991                           |                                      |                            |
| (45) Meddelt dato | 20.07.1998                           |                                      |                            |
| (73) Patenthaver  | Schering AG, D-13342 Berlin, DE      |                                      |                            |
| (72) Oppfinner    | Georg Rössling, Berlin, DE           |                                      |                            |
|                   | Andreas Sachse, Berlin, DE           |                                      |                            |
|                   | Hans-Joachim Schröter, Berlin, DE    |                                      |                            |
|                   | Claudia Sprenger, Berlin, DE         |                                      |                            |
|                   | Cornelia Wawretschek, Berlin, DE     |                                      |                            |
| (74) Fullmektig   | Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo |                                      |                            |

---

|                            |                                                                                                    |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (54) Benevnelse            | <b>Fremgangsmåte for fremstilling av virkestoffholdige liposomsuspensjoner og anvendelse derav</b> |
| (56) Anførte publikasjoner | NO 912748, US 5174930                                                                              |
| (57) Sammendrag            |                                                                                                    |

Fremgangsmåte for fremstilling av virkestoffholdige vandige liposomsuspensjoner fra en oppløsning av en liposomdannende substans eller substansblanding i en lavere alkohol med høyst 3 karbonatomer og en vandig fase, hvor virkestoffet eller virkestoffblandingen oppløses eller oppslemmes i lipidoppløsning og/eller den vandige fase. Det karakteristiske ved fremgangsmåten består i at den vandige fase innføres i den alkoholiske oppløsning under blanding med denne, den lavere alkohol fjernes ved vakuumdestillasjon og liposomsuspensjonen eventuelt frysetørres.

Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte for fremstilling av virkestoffholdige vandige liposomsuspensjoner som ikke inneholder base, fra en oppløsning av en liposomdannende substans eller substansblanding i en lavere alkohol med høyst 3 karbonatomer og en vandig fase, hvor virkestoffet eller virkestoffblandingen oppløses eller oppslemmes i lipidoppløsning og/eller den vandige fase, hvilken fremgangsmåte er særpregget ved at den vandige fase innføres i den alkoholiske oppløsning under blanding, den lavere alkohol fjernes ved vakuumdestillasjon og liposomsuspensjonen eventuelt frysetørres.

Det er kjent liposomer i kuleformede eller elipsoide lipidblærer som lukker seg, og som inneslutter en vandig fase. Alt etter antallet av de tilstedeværende lipiddobbeltsjikt skiller man mellom store og små unilamellære liposomer (LUV og SUV) av multilamellære liposomer (MLV).

De første liposomer ble fremstilt ved dispergering av lipidfilmer i vandige faser. De derved oppnådde MLV-dispersjoner kunne overføres til SUV ved bruk av egnede homogeniseringsprosesser, som f.eks. ultralydbehandling eller høytrykkshomogenisering. MLV og SUV oppviser imidlertid bare små inneslutningsvolumer (volumer innesluttet vandig fase (liter pr. mol lipid), slik at de ikke er egnet for effektiv inneslutning av hydrofile substanser.

LUV oppviser derimot et tydelig øket inneslutningsvolum og dermed en høyere inneslutningskapasitet (% av det innførte legemiddel).

De hittil vanligste fremgangsmåter for fremstilling av LUV kan sammenfattes under betegnelsen "oppløsningsmiddel-fordampning".

Den formodentlig mest kjente og med hensyn til den oppnådde inneslutning beste fremgangsmåte er REV-metoden (reversert-fase-fordampning) ifølge Papahadjopoulos (US patentskrift nr. 4.235.871). Ved denne blir lipidet, henholdsvis lipidblandingen, først oppløst i et med vann ikke blandbart

eter eller kloroform). Etter tilsetning til den legemiddelholdige vandige fase overføres blandingen til en vann-i-olje-emulsjon ved ultralydbehandling. Fra denne fjernes så oppløsningsmidlet i en rotasjonsinndamper, hvorved det først dannes  
5 en gel, som ved økning av vakuemet eller ved tilsetning av vann omdannes til en liposomsuspensjon.

I motsetning hertil blir, i henhold til den av Deamer og Bangham innførte "eterinjeksjonsmetode" [Biochim. Biophys. Acta, 443 (1976) 629-634], det likeledes i dietyleter oppløste  
10 lipid injisert inn i en varm vandig oppløsning (50-60°C) under et undertrykk. Liposomer som fås etter filtrering gjennom et 1,2 µm filter er heterogene og har en størrelse på mellom 150 og 250 nm.

Det ved disse metoder benyttede oppløsningsmiddel er  
15 ugunstig av toksikologiske og sikkerhetsmessige årsaker.

Dersom man imidlertid ved en av "eterinjeksjonsmetodene" i henhold til de ovenfor omtalte fremgangsmåter anvender etanol som oppløsningsmiddel, resulterer dette i sterkt fortynnede SUV-dispersjoner, som oppkonsentreres ved ultrafiltrering [Biochim. Biophys. Acta, 298 (1973) 1015-1019]. Den  
20 midlere størrelse av de derved oppnådde liposomer er klart mindre enn 50 nm, og MLV-andelen angis å være på 6%.

En utformning av denne fremgangsmåte er beskrevet i EP-A 0 253 619. Ved denne fremgangsmåte blir f.eks. en etanolisk lipid- eller legemiddeloppløsning som til sammen utgjør  
25 10% av det totale preparat, injisert under trykk på 1.000-3.000.000 hPa i en vandig fase som omrøres ved hjelp av en homogenisator. Ved denne fremgangsmåte, som er meget kostbar, fås ingen unilamellære liposomer. For fremstilling av  
30 liposomsuspensjoner som inneholder hydrofile virkestoffer, er denne fremgangsmåte uegnet.

Nevnes skal også en fremgangsmåte for fremstilling av liposomer ved bruk av vannoppløselige oppløsningsmidler, som vedrører fremstilling av en "monofase" (WO 85/00751). Denne  
35 énfasede blanding fremstilles som regel fra 5 ml av det lipidholdige oppløsningsmiddel (f.eks. etanol) og 0,2 ml av den vandige komponent. Oppløsningsmidlet fjernes så ved at det innledes en inert gass under samtidig ultralydbehandling av blandingen, hvorved det fås en film. Denne resuspenderes så i

en vandig fase. Derved fås de såkalte MPV (monophasic vesicles = énfaseblærer) som oppviser flere lipiddobbelsjikt. Til forskjell fra de klassiske MLV skal disse oppvise en forhøyet stabilitet i buffer og øket inneslutting.

5           Til slutt skal også nevnes den i EP-A 0 349 429 beskrevne fremgangsmåte ved hvilken en etanolisk lipidoppløsning, som eventuelt inneholder virkestoffet, innføres under svak omrøring i en vandig fase. Som egne forsøk har vist, oppnås det ved denne tidligere kjente fremgangsmåte en vesentlig  
10 lavere inneslutningskapasitet enn ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Dessuten har fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen den fordel at man også ved lipidkonsentrasjoner på over 10%, beregnet på den etanoliske fase, kan oppnå høy inneslutningskapasitet eller sågar en ytterligere økning av inneslutningskapasiteten.  
15

Sammenlignet med denne tidligere kjente fremgangsmåte oppviser fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen den fordel at den er teknisk gjennomførbar på enkel måte også i større målestokk. Bruk av sterkt toksiske eller meget lett antennebare  
20 oppløsningsmidler unngås. Nevnes skal også den meget gode reproduserbarhet av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen med hensyn til den oppnådde inneslutting av virkestoff og liposomstørrelsen og likeledes den meget høye grad av virkestoffinneslutting i liposomene på inntil mer enn 50% i liposomene  
25 og den ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen oppnådde uvanlig høye virkestoffkonsentrasjon i liposomsuspensjonene (inntil 800 mg/ml). Dessuten er det verdt å nevne at det ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er lykkedes å fremstille liposomsuspensjoner som inneholder  
30 bare et meget lavt restinnhold av oppløsningsmiddel og som oppviser en god lagringsbestandighet. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen lar seg også utføre uten problemer under aseptiske betingelser.

For utførelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen  
35 kan man benytte de samme liposomdannende substanser som ved de tidligere kjente fremgangsmåter.

Egnede liposomdannende substanser er de vanligvis amfipatiske lipider eller lipidblandinger, som f.eks. fosfolipider, sfingomyeliner eller eterfosfolipider. Disse lipi-

der kan bære rettkjedede eller forgrenede, mettede eller umettede, like eller ulike asyldsidekjeder. Egnede fosfolipider er fosfatidylcholinene, fosfatidyletanolaminene, fosfatidylserinene, fosfatidylinositene, fosfatidylglycerolene eller  
5 fosfatidsyrene. Egnede eterfosfolipider er f.eks. plasmalogenene (Dr. Otto-Albert Neumüller: Römpfs Chemie-Lexikon; Franckische Verlagshandlung, Stuttgart (DE) 2665, 3159, 3920 og 4045).

For fremstilling av liposomene kan man også benytte  
10 blandinger av disse lipider og spesielt også blandinger av disse lipider med kolesterol, kolesterolhemisuccinat,  $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocopherolhemisuccinat og/eller ladningsbærere som f.eks. stearylamin, stearinsyre, dietylfosfat, oljesyre, palmitinsyre, gallesyre som f.eks. klorsyre, glykolsyre. Egnede  
15 blandinger kan inneholde inntil 60 mol% kolesterol og inntil 20 mol% ladningsbærere. Som oppløsningsmiddel for disse fosfolipider eller blandinger anvendes fortrinnsvis isopropanol og etanol, spesielt etanol.

Generelt bør fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen også  
20 være gjennomførbar med andre vannoppløselige, laverekokende oppløsningsmidler enn lavere alkoholer. Egnert er f.eks. tetrahydrofuran. Gjennomføringen av fremgangsmåten blir imidlertid vesentlig mer kostbar enn ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

25 For utførelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen benyttes fortrinnsvis alkoholiske oppløsninger som inneholder fra 0,2 g til 30 g liposomdannende substans (substansblanding) pr. 100 ml oppløsningsmiddel. Om nødvendig tilberedes disse oppløsninger under oppvarmning av komponentene.

30 Som allerede nevnt utføres fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen på den måte at den vandige fase innføres i den alkoholiske oppløsning under blanding (f.eks. kraftig omrøring) og ved at den lavere alkohol fjernes f.eks. ved vakuumdestillasjon eller ved innledning av nitrogen.

35 Eventuelt blir den etter blandingen oppnådde dispersjon blandet i noen tid (10-180 minutter) ved en temperatur fra 20 til 90°C, før oppløsningsmidlet fraskilles helt eller delvis.

Temperaturene som er velegnede ved fremgangsmåten

ifølge oppfinnelsen, er avhengige av oppløseligheten av de liposomdannende substanser og av deres faseovergangstemperatur (tc), den termiske stabilitet av virkestoffet eller virkestoffblandingen og damptrykket av alkoholen som skal fraskilles. De ligger fortrinnsvis i området mellom 20°C og 90°C (spesielt mellom 40°C og 70°C). Vanligvis vil det være tilstrekkelig å arbeide ved et vakuum på fra 10 h Pa til 100 h Pa.

Den ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendte vandige fase kan om ønsket inneholde bufferstoffer og/eller isotoniserende tilsetninger. Egnede tilsetninger er f.eks. uorganiske eller organiske salter eller bufferstoffer, som f.eks. natriumklorid, TRIS-buffer, fosfatbuffer, citratbuffer, glysinbuffer, citrat-fosfat-buffer, maleatbuffer, osv., mono- eller disakkarider, som f.eks. glukose, laktose, sakkarose eller trehalose, sukkeralkoholer som mannit, sorbit, xylit eller glyserin eller vannoppløselige polymerer som dekstran eller polyetylenglykol.

Da lipidene og også enkelte av virkestoffene kan være oksidasjonsømfintlige, kan den vandige fase tilsettes antioksidasjonsmidler, som f.eks. natriumaskorbat, tocoferol eller natriumhydrogensulfitt.

De vandige liposomsuspensjoner som fås ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, benyttes fortrinnsvis for innkapsling av vannoppløselige virkestoffer.

Slike vannoppløselige virkestoffer er f.eks. diagnostika, som f.eks. røntgenkontrastmidlene iotrolan, iopromid, ioheksol, iosimid, metrizamid, salter av amidoeddiksyre, iotroxinsyre, iopamidol, 5-hydroksyacetamido-2,4,6-trijodisofthalsyre-(2,3-dihydroksy-N-metylpropyl)-(2-hydroksyetyl)-diamid (= ZK 119095) og 3-karbamoyl-5-[N-(2-hydroksyetyl)-acetamido]-2,4,6-trijod-benzosyre-[(1RS,2SR)-2,3-dihydroksy-1-hydroksymetylpropyl]-amid (= ZK 139129) eller NMR-kontrastmidler, som f.eks. gadolinium-DTPA, gadolinium-DOTA og gadoliniumkomplekset av 10-[1-hydroksymetyl-2,3-dihydroksypropyl]-1,4,7-tris-(karboksymetyl)-1,4,7,10-tetraazacyklodecans].

Egnede terapeutiske virkestoffer er bl.a. antibiotika, som f.eks. gentamycin eller kanamycin, cytostatika som f.eks. doxorubicin-hydroklorid eller cyklofosfamid og

virustatika, som f.eks. vidarabin, eller virkestoffer som mitoksantron-hydroklorid.

Disse vannoppløselige virkestoffer oppløses i den vandige fase, før fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen utføres.

5 Dessuten kan de vandige liposomsuspensjoner anvendes for innkapsling av virkestoffer som er tungt oppløselige i vann.

Slike virkestoffer er f.eks. plantebeskyttelsesmidler, som f.eks. tungtoppløselige insekticider eller herbicider, og spesielt tungtoppløselige farmasøytiske virkestoffer.

I vann tungtoppløselige eller uoppløselige farmasøytiske virkestoffer som faller inn under de følgende virkestoffgrupper, egner seg f.eks. for fremstilling av vandige suspensjoner ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen:

Gestagenvirksomme steroidhormoner som f.eks. 13-etyl-17 $\beta$ -hydroksy-18,19-dinor-17 $\alpha$ -pregn-4-en-20yl-3-on (= levonorgestrel), 13-etyl-17 $\beta$ -hydroksy-18,19-dinor-17 $\alpha$ -pregna-4,15-dien-20yn-3-on (= gestoden) eller 13-etyl-17 $\beta$ -hydroksy-11-metylen-18,19-dinor-17 $\alpha$ -pregn-4-en-20yn.

Estrogen-virksomme steroidhormoner som f.eks. 3-hydroksy-1,3,5-(10)-østratrien-17-on (= østron) eller 1,9-nor-17 $\alpha$ -pregna-1,3,5(10)-trien-20-yn-3,17 $\beta$ -diol (etynyløstradiol).

Androgenvirksomme steroidhormoner som f.eks. 17 $\beta$ -hydroksy-4-androsten-3-on (= testosteron) og dennes ester eller 17 $\beta$ -hydroksy-1 $\alpha$ -metyl-5 $\alpha$ -androsten-3-on (= mesterolon).

Antiandrogenvirksomme steroidhormoner som f.eks. 17 $\alpha$ -acetoksy-6-klor-1 $\beta$ ,2 $\beta$ -dihydro-3 H-cyklopropa-[1,2]-pregna-1,4,6-trien-3,20-dion (cypoteronacetat).

30 Kortikoider som f.eks. 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroksy-4-pregnen-3,20-dion (= hydrokortison), 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroksy-1,4-pregnadien-3,20-dion (= prednisolon), 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -21-trihydroksy-6 $\alpha$ -metyl-1,4-pregnatrien-3,20-dion (= metylprednisolon) og 6 $\alpha$ -fluor-11 $\beta$ ,21-dihydroksy-16 $\alpha$ -metyl-1,4-pregnadien-3,20-dion (= difluorkortolon) og deres estere.

Ergoliner som f.eks. 3-(9,10-dihydro-6-metyl-8 $\alpha$ -ergolinyl)-1,1-diethylharnstoff (= ergolin), 3-(2-brom-9,10-dihydro-6-metyl-8 $\alpha$ -ergolinyl)-1,1-diethylharnstoff (= bromergolin) eller 3-(6-metyl-8 $\alpha$ -ergolinyl)-1,1-diethylharnstoff (=

tergurid).

Antihypertonika som f.eks. 7 $\alpha$ -acetyltio-17 $\alpha$ -hydroksy-3-okso-4-pregnen-21-karboksytsyre- $\gamma$ -lakton (= spironolakton) eller 7 $\alpha$ -acetyltio-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metylen-3-okso-17 $\alpha$ -pregna-1,4-dien-21,17-karbolakton (= mespirenon).

Antikoagulanter som f.eks. 5-[heksahydro-5-hydroksy-4-[3-hydroksy-4-metyl-1-okten-6-ynyl)-2(1H)-pentalenyliden)]-pentansyre (= iloprost).

Psykofarmaka som f.eks. 4-(3-cyklopentyloksy-4-metoksy-fenyl-2-pyrrolidon (= rolipram) og 7-klor-1,3-dihydro-1-metyl-5-fenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (= diazepam).

Karotinoider som f.eks.  $\alpha$ -karotin og  $\beta$ -karotin.

Fettoppløselige vitaminer som f.eks. vitaminene av gruppen vitamin A, Vitamin D, vitamin E og vitamin K.

En annen gruppe er  $\beta$ -karbolinene beskrevet f.eks. i europeiske patentsøknader nr. 234.173 og 239.667. Som  $\beta$ -karboliner kan f.eks. 6-benzoyloksy-4-metoksy-metyl- $\beta$ -karbolin-3-karboksytsyre-isopropylester (= becarnil) og 5-(4-klorfenoksy)-4-metoksymetyl- $\beta$ -karbolin-3-karboksytsyre-isopropylester (= Cl-PHOCIP) nevnes.

Nevnes skal også tungtoppløselige eller uoppløselige kontrastmidler, som f.eks. røntgenkontrastmidlet iodipamid-etyler eller NMR-kontrastmidler som jern- eller manganporfyrinchelat og dessuten magnetitt.

Som egnede virkestoffer skal også salisytsyre, retinolsyre og azelainsyre nevnes. Dessuten kan antimycotin og likeledes amfotericin-B, iconacol eller mecanazol benyttes. Visse virkestoffer blir for utførelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen oppløst i den alkoholiske oppløsning eller oppslemmet i denne og/eller i den vandige fase.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen blir det pr. gram liposomdannende substans (substansblanding) vanligvis benyttet fra 0,05 til 10 g, fortrinnsvis fra 1 til 3 g, virkestoff. Ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan man på enkel måte fremstille sterile liposomsuspensjoner, idet man forut for utførelsen av fremgangsmåten filtrerer begge oppløsninger under sterile betingelser og utfører alle påfølgende prosesstrinn under aseptiske betingelser.

Den i liposomsuspensjonene oppnåelige inneslutting er



avhengig av arten av virkestoffet og av den liposomdannende substans (substansblanding) og av forholdet mellom disse. Om ønsket kan det ikke innkapslede virkestoff fjernes f.eks. ved ultrafiltrering, dialyse, mikrofiltrering eller sentrifuge-  
5 ring.

De oppnådde liposomsuspensjoner kan oppbevares i den form de fås. Alternativt kan liposomfunksjonene overføres i en stabil lagringsform ved frysetørking. Før frysetørkingen kan det, om nødvendig, tilsettes blant annet f.eks. tilsetninger  
10 som mannitol eller sorbitol og/eller elektrolytter og viskositetsmodifiserende midler som f.eks. natriumklorid.

Lyofilisatet kan resuspenderes ved hjelp av dobbeltdestillert vann eller vandige faser som kan inneholde de samme tilsetninger som de vandige faser benyttet for liposom-  
15 fremstillingen.

Mengden av resuspensjonsmedium kan være fra 0,5 til 20 ml, fortrinnsvis fra 1 til 6 ml, pr. gram lyofilisat. De oppnådde suspensjoner kan anvendes direkte eller etter filtrering gjennom et filter av egnet porestørrelse.

20 De ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen fremstilte liposomer kan f.eks. - når de inneholder kontrastmiddel for NMR- eller røntgendiagnostikk - anvendes ved forskjellige diagnostiske metoder. Blant disse kan f.eks. nevnes tumordiagnostikk i organer i det retikuloendoteliale system  
25 (f.eks. leveren eller milten) eller andre intravasalt tilgjengelige vev og likeledes ved artrografi. Ekstravasal anvendelse av slike liposomsuspensjoner (f.eks. subkutan, intramuskulær eller intraperitoneal anvendelse) kan også anvendes for diagnostiske formål som indirekte og direkte lymfografi eller for  
30 terapeutiske formål (som f.eks. i.m. depotpreparater). Selvfølgelig er det også mulig å benytte preparatene oralt, idet preparatene eventuelt fylles i magesaftresistente kapsler.

Videre kan virkestoffholdige liposomsuspensjoner fremstilt i henhold til oppfinnelsen ved egnet lipidsammenset-  
35 ning anvendes som blodreservemidler eller som målrettede legemiddelbærere.

De etterfølgende utførelseseksempler belyser oppfinnelsen nærmere. I disse eksempler benyttes de følgende forkortelser:

- PC = fosfatidylcholin "S 100" fra firmaet Lipoid KG.  
CH = kolesterol i pulverform (JP) fra Merck AG.  
SS = stearinsyre i ren form fra Fluka AG.  
DPPG = dipalmitoylfosfatidylglycerol DPPG fra Lipoid KB.  
5 HSPC = hydrogenert soyalecitin ("Phospholipon 90H") fra  
Nattermann AG  
DCP = diceylfosfat fra Sigma.

#### Eksempel 1

- 10 0,25 g lipidblanding (PC/CH/SS - 4:5:1 mol:mol:mol)  
oppløses ved 70°C i 100 ml etanol og sterilfiltreres. Deretter  
overføres oppløsningen til en 55°C temperert reaksjonskolbe,  
hvor den blandes under omrøring (300 omdreininger pr. minutt)  
med en sterilfiltrert virkestoffoppløsning (inneholdende 27,75  
15 g iopromid i 200 ml vandig 20 mM tris-HCl-buffer; pH 7,5.

Deretter avdestilleres alkoholen ved 55°C i et vakuum  
på 5000 Pa, og den oppnådde liposomsuspensjon undersøkes med  
hensyn til dens egenskaper.

- Deretter fylles liposomsuspensjonen direkte i porsjo-  
20 ner på 20 g i 50 ml's glass i fusjonsflasker hvorefter det  
foretas frysetørking. De oppnådde lyofilisater resuspenderes  
på en slik måte at det fås en virkestoffkonsentrasjon på ca.  
200 mg/ml, og det foretas ny undersøkelse.

#### 25 Eksempel 2

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 1, men det  
benyttes 18,5 g iopromid.

#### Eksempel 3

- 30 Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men det  
benyttes 13,9 g lipidblanding.

#### Eksempel 4

- Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men det  
35 benyttes 18,5 g lipidblanding.

Eksempel 5

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men iotrolan anvendes istedenfor iopromid.

5 Eksempel 6

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men iopamidol anvendes istedenfor iopromid.

Eksempel 7

10 Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men ioheksal anvendes istedenfor iopromid.

Eksempel 8

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men det  
15 ikke-ioniske kontrastmiddel 5-hydroksyaceta-  
mid-2,4,6-trijod-  
isofthalsyre-(2,3-dihydroksy-N-metylpropyl)-(2-hydroksyetyl)-  
diamid benyttes istedenfor iopromid.

Eksempel 9

20 Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men det  
benyttes en lipidblanding PC/CH/SS - 4:4:2 mol:mol:mol.

Eksempel 10

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men det  
25 benyttes en lipidblanding PC/CH/PG - 4:5:1 mol:mol:mol.

Eksempel 11

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men det  
benyttes en lipidblanding PC/CH/SS - 6:3:1 mol:mol:mol.

30

Eksempel 12

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men det  
benyttes en lipidblanding PC/CH/DCP - 4:5:1.

35 Eksempel 13

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men det  
benyttes en lipidblanding PC/CH - 1:1.

Eksempel 14

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men det benyttes en lipidblanding PC/HSPC/CH/SS - 2:2:5:1.

5 Eksempel 15

Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men satsstørrelsen tidobles.

Eksempel 16

10 Forsøket utføres som beskrevet i eksempel 2, men satsstørrelsen gjøres 150 ganger større.

Den etterfølgende tabell viser resultatene oppnådd i eksemplene 1-16.

15

20

25

30

35

Tabell

| Eks. | Lipid-sammensetning.   | Virkestoff | Liposomsuspensjon | Resuspendert lyofilisat |                   | Antall forsøk       |                   |
|------|------------------------|------------|-------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
|      |                        |            |                   | Inne-                   |                   | Inne-               |                   |
|      |                        |            |                   | Størrelse [nm] ± SD     | slutting [%] ± SD | Størrelse [nm] ± SD | slutting [%] ± SD |
| 1    | PC/CH/SS 4:5:1         | Iopromid   | 309±23            | 25,9±2,7                | 515±47            | 29,6±1,3            | 3                 |
| 2    | PC/CH/SS 4:5:1         | Iopromid   | 360±30            | 36,1±7,7                | 439±87            | 42,5±3,7            | 6                 |
| 3    | PC/CH/SS 4:5:1         | Iopromid   | 317±19            | 53,9±2,0                | 344±9             | 42,8±4,4            | 3                 |
| 4    | PC/CH/SS 4:5:1         | Iopromid   | 274±23            | 41,7±3,6                | 451±17            | 58,0±6,4            | 3                 |
| 5    | PC/CH/SS 4:5:1         | Iotrolan   | 383               | 39,9                    | 564               | 52,9                | 1                 |
| 6    | PC/CH/SS 4:5:1         | Ipamidol   | 331               | 30,8                    | 452               | 50,6                | 1                 |
| 7    | PC/CH/SS 4:5:1         | Iohepal    | 326               | 22,6                    | 441               | 29,4                | 1                 |
| 8    | PC/CH/SS 4:5:1         | ZK 119095  | 333               | 24,2                    | 520               | 40,4                | 1                 |
| 9    | PC/CH/SS 4:4:2         | Iopromid   | 338±36            | 20,1±1,4                | 586±71            | 37,2±1,7            | 3                 |
| 10   | PC/CHDPPG 4:5:1        | Iopromid   | 363               | 49,4                    | 548               | 35,4                | 1                 |
| 11   | PC/CH/SS 6:3:1         | Iopromid   | 366±70            | 33,9±5,4                | 450±31            | 32,7±2,3            | 7                 |
| 12   | PC/CH/DCP 4:5:1        | Iopromid   | 291±40            | 26,4±6,8                | 588±95            | 38,1±7,3            | 5                 |
| 13   | PC/CH/ 1:1             | Iopromid   | 826               | 44,3                    | 623               | 20,2                | 1                 |
| 14   | PC/HSPC/CH/SS/ 2:2:5:1 | Iopromid   | 344±10            | 25,0±1,9                | 417±92            | 44,2±0,2            | 2                 |
| 15   | PC/CH/SS 4:5:1         | Iopromid   | 313±65            | 34,2±4,5                | 461±83            | 43,1±4,5            | 6                 |
| 16   | PC/CH/SS 4:5:1         | Iopromid   | 352               | 38,1                    | 483               | 39,0                | 1                 |

Eksempel 17

Restetanolinholdet i de ifølge eksempel 2 fremstilte liposomsuspensjoner før og etter frysetørking bestemmes for 8 charger ved gasskromatografering. I den opprinnelige liposom-  
5 suspensjon bestemmes etanolinnholdet til  $0,59 \pm 0,010$  % (m/V).

Eksempel 18

Liposomsuspensjonene og lyofilisatene fremstilt i henhold til eksempel 2 lages ved 4,25 og 40°C. For bestemmelse  
10 av stabiliteten bestemmes utseendet, størrelsen, innesluttin-  
gen og pH-verdien - for lyofilisatet etter resuspending - på det aktuelle tidspunkt.

Etter flere måneders lagring oppviste de resuspenderte lyofilisater ingen signifikante avvik med hensyn til de  
15 undersøkte egenskaper.

De således fremstilte liposomsuspensjoner oppviser ved farmakologiske tester de følgende egenskaper:

Test A

20 De i henhold til eksempel 2 fremstilte resuspenderte lyofilisater undersøkes med hensyn til akutt toksisitet etter én gangs administrering til mus og rotter.

LD<sub>50</sub> bestemmes til henholdsvis 2,8 g I/kg KGW for mus (totalt jod) og 3,0 g I/kg KGW for rotter.

25

Test B

For resuspenderte lyofilisater fremstilt i henhold til eksempel 2 bestemmes den subakutte toksisitet på rotter (n = 6).

30 Etter 6 administreringer på hver 1 g I/kg KGW (totalt jod) med 3 dagers mellomrom fastslås det at det ikke har inntrådt noen endringer i de histo-patologiske eller kliniske parametere.

35 Test C

De resuspenderte lyofilisater fremstilt i henhold til eksempel 2 undersøkes med henblikk på deres organtilbinding etter intravenøs administrering i rotter.

1 time etter administrering av 100 mg I/kg KGW

(totalt jod) påvises 0,54 I/g fuktighet, svarende til 24% av den tilførte dose.

#### Test D

De resuspenderte lyofilisater fremstilt i henhold til eksempel 2 administreres intravenøst i en dose på 100 mg totalt jod/kg KGW i kaniner med levertumor. Den resulterende tetthetsdifferanse lever/tumor er etter 1 time på 35 Hounsfield-enheter (HU).

#### Test E

De resuspenderte lyofilisater fremstilt i henhold til eksempel 2 undersøkes med henblikk på deres anvendelighet for indirekte CT-lymfografi på hunder.

3 timer etter interdigital administrering av 200 mg totalt jod (i 3 ml liposomsuspensjon) måles ved CT en økning av tettheten på maksimalt 200 HU i de poplietale og iliakale lymfeknuter.

### P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av virkestoffholdige vandige liposomsuspensjoner som ikke inneholder base, fra en oppløsning av en liposomdannende substans eller substansblanding i en lavere alkohol med høyst 3 karbonatomer og en vandig fase, hvor virkestoffet eller virkestoffblandingen oppløses eller oppslemmes i lipidoppløsning og/eller den vandige fase, karakterisert ved at den vandige fase innføres i den alkoholiske oppløsning under blanding, den lavere alkohol fjernes ved vakuumdestillasjon og liposomsuspensjonen eventuelt frysetørres.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at virkestoffet er godt oppløselig i vann og befinner seg i den vandige fase.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 og 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at virkestoffet er et kon-  
trastmiddel.

5

4. Anvendelse av liposomsuspensjoner fremstilt i henhold  
til krav 1 - 3 for fremstilling av media for tumordiagnostikk.

10

5. Anvendelse av liposomsuspensjoner fremstilt i henhold  
til krav 1 - 3 for fremstilling av media for indirekte lymfo-  
grafi.

15

20

25

30

35