



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8501010**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Verbeteringen van of verband houdende met de interleukinetherapie.**
- ⑤1 Int.Cl.: A61K37/02, A61K9/00, C07K15/12.
- ⑦1 Aanvrager: Sandoz A.G. te Basel, Zwitserland.
- ⑦4 Gem.: Ir. L.W. Kooy c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade.
Dr. Kuyperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

- ②1 Aanvraag Nr. 8501010.
- ②2 Ingediend 4 april 1985.
- ③2 Voorrang vanaf 9 april 1984, 9 april 1984, 9 april 1984, 9 april 1984, 10 augustus 1984, 19 september 1984, 19 september 1984.
- ③3 Land van voorrang: Groot-Brittannië (GB).
- ③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 8409125, 8409126, 8409127, 8409128, 8420381, 8423700, 8423701.
- ⑥2 --

- ④3 Terinzage gelegd: 1 november 1985.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Verbeteringen van of verband houdende met de interleukine-therapie.

5 Deze uitvinding houdt verband met de interleukine-therapie.

10 Interleukine-2 (hierna aangeduid met IL-2) is een in de natuur voorkomende proteïnefactor die voor het eerst in 1976 werd ontdekt. Ze wordt verkregen uit T-cellen geactiveerd door een antigeen of lectine en is een factor die essentieel is voor de vermeerdering van T-cellen. IL-2's van verschillende structuren zijn uit een aantal dierspecies geïsoleerd, bijvoorbeeld muizen, primaten, zoals de gibbon's, apen en mensen. Menselijke en andere IL-2's zijn uit vele bronnen gezuiverd, zoals perifere bloedlymfocyten, tonsilaire
15 lymfocyten, miltlymfocyten, T-cel leukemieën en T-cel hybride-culturen.

20 Zoals hiervoor reeds is vermeld, is IL-2 een essentiële factor voor de vermeerdering van T-cellen, die zelf innig betrokken zijn bij de lichaamsimmunoresponsmechanismen. Van IL-2 wordt verwacht dat ze een therapeutisch potentiaal van immense afmetingen zal hebben. Ze kan in het bijzonder van belang zijn voor de therapie van tumoren, aangezien ze tot een vermeerdering van antigeen specifieke T-cellen leidt, bijvoorbeeld tegen tumorantigenen en deze T-cellen kunnen
25 de tumorgroei remmen. Het is eveneens bekend dat IL-2 de produktie van gamma-interferon induceert en natuurlijke dodercellen aktiveert. Eveneens wordt verwacht dat IL-2 een verscheidenheid van toepassingen tegen immunologische aandoeningen zal hebben, zoals neoplastische aandoeningen, bacteriele of
30 virale infecties, immuundeficientieziekten, auto-immuunziekten enz. (zie B.Papernmaster en med., Adv. Immunopharm. (1980) 507).

35 Zoals bij andere in de natuur voorkomende producten, zoals de interferonen, was IL-2 voor de komst van de genetische manipulatietechniek, slechts in geringe hoeveelheden beschikbaar.

8501010

Volgens een methodologie analoog aan die welke reeds eerder voor andere proteïnen (bijvoorbeeld gamma-interferon) werd gepubliceerd, werd echter de structuurbepaling en aanduiding van een gekloond geen voor mensen IL-2 uitgevoerd (zie S. Taniguchi en med., Nature (1983) 302, blz. 305-310 en het Europese octrooischrift 91539. Dit speciale IL-2 wordt hierna als bekend IL-2 aangeduid.

Op basis van de nucleotide coderingsvolgorde werd de aminozuurvolgorde van menselijk IL-2 polypeptide, namelijk dat welke de aminozuren genummerd van 1 tot 153 in figuur 3a van het hiervoor genoemde Nature artikel bevat, gededuceerd. Er werd echter gepostuleerd, dat de eerste 20 aminozuren van deze volgorde bij een transmembraantransport konden worden gesplitst. Het volledige menselijke IL-2 zou dan uit 133 aminozuren bestaan, te beginnen met Ala op de 21-plaats.

Deze structuur van menselijk IL-2 is sindsdien in het laboratorium van aanvraagster en in andere laboratoria bevestigd.

Het is eveneens mogelijk door toepassing van recombinant DNA-technieken IL-2's met een verschillende structuur te bereiden. Zo kunnen bijvoorbeeld modificaties van het menselijk IL-2 polypeptide met een of een aantal aminozuren die afwezig zijn of door andere aminozuren zijn vervangen, zoals bijvoorbeeld beschreven in het hiervoor genoemde Europese octrooischrift, in het bijzonder op de bladzijden 23-25 ervan, worden verkregen door op een overeenkomstige wijze het menselijk IL-2 geen te modificeren. Desgewenst kunnen bijvoorbeeld cysteine-resten door andere aminozuren, bijvoorbeeld serine, worden vervangen, zoals bijvoorbeeld beschreven in Cetus Europese octrooischrift 109748 en het Belgische octrooischrift 898016, bijvoorbeeld IL-2-serine-125.

Andere voorbeelden van dergelijke interleukinen zijn beschreven in het PCT octrooischrift WO 85/00817. Hieronder

8501010

vallen IL-2 Gln-26, IL-2 Phe-121 en IL-2 Stop 121.

Bovendien kunnen IL-2's uit verschillende bronnen, zoals de gibbonaap, volgens recombinant DNA-technieken worden verkregen en modificatie hiervan kan eveneens op een overeen-
5 komstige wijze worden uitgevoerd. Verder kunnen IL-2's, zoals hiervoor is vermeld, uit natuurlijke bronnen worden afgescheiden (hoewel in relatief geringe hoeveelheden) en kunnen verschillen van de produkten die volgens de recombinant DNA-technologie worden geproduceerd, bijvoorbeeld wat betreft
10 glycosylering. Bovendien kunnen varianten worden verkregen.

IL-2's kunnen eveneens worden gevormd door het kweken van mensencellen, bijvoorbeeld in aanwezigheid van een inducer. Voorbeelden zijn IL-2 A-1, IL-2 A-2, IL-2 B-1 en IL-2 B-2, zoals gedefinieerd in de Deense octrooi-
15 aanvraag 3317/84 en het Europese octrooschrift 132359.

Met het hierin gebruikte "interleukine" wordt elk polypeptide bedoeld, waaronder elk hiervoor beschreven polypeptide valt, hoewel daartoe niet is beperkt, zowel afgescheiden uit natuurlijke bronnen, als bereid volgens een
20 synthetische of biosynthetische methode en met een IL-2 werkzaamheid.

Volgens de onderhavige uitvinding is het aanbevolen interleukine menselijk IL-2 of een modificatie daarvan, bij voorkeur bereid volgens recombinant DNA-methoden. Tot nu
25 toe uitgevoerde proeven met interleukine geschieden door injekteren, bijvoorbeeld intraveneus. Hieruit bleek bijvoorbeeld dat menselijk IL-2 een zeer korte halveringstijd van korter dan 5 minuten had. Er bestaat dus duidelijk behoefte aan een parenterale vorm van interleukine met een vertraagde
30 afgifte, die een voldoende lange werkingsduur verschaft, doch tot nu toe is weinig over specifieke galenische preparaten van interleukinen gepubliceerd.

Verder is uit proeven die in de laboratoria van aanvraagster zijn uitgevoerd gebleken dat interleukine in
35 liposomale vormen kan worden opgenomen, die, bij toediening,

8501010

bijvoorbeeld intraveneus, nog een IL-2 werking vertonen. Bovendien hebben de liposomen volgens de onderhavige uitvinding een verlengde halveringstijd en zijn passief een doel in de milt, longen, beenmerg en lymfennoduli.

5 De onderhavige uitvinding verschaft diensten-
gevolge interleukine-bevattende liposomen.

Liposomen kunnen volgens de uitvinding worden
bereid door inkapseling van een interleukine in een liposoom-
vormend materiaal.

10 Liposomen zijn volledig gesloten, uit twee lagen
bestaande membranen die een waterige fase met het interleukine
bevatten. Het interleukine kan in de waterige fase en/of in
het membraan aanwezig zijn. Ze kan de vorm van een uni -
lamellaire blaas of een oligo- of multi-lamellaire blaas in
15 de vorm van concentrische , uit twee lagen bestaande, membranen,
die door een laag water van elkaar zijn gescheiden, hebben.

Ze kunnen volgens vele verschillende methoden
worden vervaardigd -zie F.Szoka en D. Papahadjopoulos,
"Liposomes and their uses in biology and medicine" Ann. N.Y.
20 Acad. Sci. 308, 1-462, (1978); R.L. Juliano & D. Layton,
"Liposomes as a drug delivery system" in Drug delivery systems
blz. 189-236, Oxford University Press, Inc., New York, 1980,
doch de methode volgens de uitvinding heeft de voorkeur, aan-
gezien hiermee liposomen met bijzonder belangrijke eigen-
25 schappen worden verkregen. Zo zijn de volgens deze methode
verkregen liposomen bijzonder stabiel, bijvoorbeeld tegen
weglekken van interleukine en de werkwijze volgens de uit-
vinding is geschikt voor technische toepassing.

De liposomen kunnen uit vele lipiden die in staat
30 zijn blaaswanden te vormen worden verkregen. Aanbevolen lipiden
zijn fosfolipiden, zoals in de natuur voorkomend lecithine
(bijvoorbeeld lecithine uit eieren of sojabonen), synthe-
tische lecithinen, kefalinen en sfingomyelinen. Ook kunnen
andere fosfatidylcholinen, fosfatidine- zuren, lysofosfatidyl-
35 cholinen, sfingolipiden, fosfatidylglycerol, cardiolipinen,

8501010

glycolipiden, gangliosiden en cerebrosiden worden gebruikt.

Onder voorbeelden van lecithinen vallen EPIKURONS verkrijgbaar bij Lucas Meyer, Hamburg 28, West-Duitsland. Een voorbeeld hiervan heeft het volgende fosfolipidegehalte:

5 fosfatidylcholine: 44-7%, fosfatidylethanolamine: 22-25 %,
fosfatidylinosit: 0-2 %, vetzuurgehalte: verzadigd; palmitine-
zuur: 9-11 %, stearinezuur 2-4 %, onverzadigd: linoleinezuur:
63-67 %, linoleenzuur: 5-8 %, oliezuur: 14-18 %, bekend als
EPIKURON 145 V. Een ander produkt bevat meer dan 95 % fosfati-
10 dylcholine, bijvoorbeeld 95-98 % en onverwegend onverzadigde
zuren, bijvoorbeeld oliezuur: 10-12 %, linoleinezuur: 62-65 %
linoleenzuur: 5-6 %, evenals verzadigde zuren, bijvoorbeeld
palmitinezuur: 15-17 % en stearinezuur 3-4 %, zoals EPIKURON
200.

15 Het verdient aanbeveling een hoog gehalte aan
onverzadigde zuren te hebben. Desgewenst past men een lecithine
met een hoog gehalte aan verzadigde zuren, bijvoorbeeld stea-
rinezuur en fosfatidylcholine van 95 % of meer, bijvoorbeeld
SOJA PHOSPHITID NC 95, of zuivere equivalenten geschikt voor
20 farmaceutische toepassing, bijvoorbeeld te betrekken bij
NATTERMANN CHEMIE GmbH, Keulen, West-Duitsland, toe.

 Synthetische fosfolipiden kunnen gewijzigde
alifatische gedeelten, zoals hydroxylgroepen, vertakte kool-
stofketens cycloderivaten, aromatische derivaten, ethers,
25 amiden, poly-onverzadigde derivaten, gehalogeneerde derivaten
of gemodificeerde hydrofiele gedeelten, die koolhydraat-,
glycol-, fosfaat-, fosfonaat-, kwaternaire amine-, sulfaat-,
sulfonaat-, carboxyl-, amine-, sulfhydryl- en imidazool-
groepen bevatten, bijvoorbeeld zoals in dimyristoyl-, dipal-
30 mitoyl- of distearoyl-fosfatocholine-derivaten, bevatten.

 Desgewenst kan in het uiteindelijke liposoom
de tweelaag bijvoorbeeld tot 50 (mol) % andere lipiden,
bijvoorbeeld steroïden, zoals cholesterol, bevatten.

 Het verdient aanbeveling dat in het uiteindelijke
35 liposoom een steroïde, zoals cholesterol, aanwezig is. Geschikte

8501010

gewichtsverhoudingen van lipide tot steroïde kunnen liggen tussen 6:1 en 1:1.

Desgewenst kan de bi-laag een lecithine kefaline of sfingomyeline bevatten, met tot 10 (mol) % van een toevoegsel, teneinde de opname te bevorderen, bijvoorbeeld anionogene verbindingen, zoals zuren, bijvoorbeeld dicetylfosfaat, fosfatidinezuur, natriumtaurocholaat, fosfatidylserine, (Merck) of kationogene verbindingen, bijvoorbeeld aminen, zoals stearylamine. Het verdient aanbeveling fosfatidylserine (verkrijgbaar van bijvoorbeeld Merck, West-Duitsland) te gebruiken.

Bevat het lipide extra excipienten, dan verdient het aanbeveling een oplossing van het lipide en excipienten bijvoorbeeld in methyleenchloride in een reaktievat in te dampen, onder vorming van een lipidefilm op het oppervlak van het vat, voordat het lipide met het interleukine wordt gemengd.

De liposomen kunnen volgens bekende methoden worden verkregen, bijvoorbeeld door bestralen, bijvoorbeeld met ultrasoon geluid, onder toepassing van milde omstandigheden ter vermindering van het afbreken van het interleukine. Door vorming van een oplossing van het lipide, bijvoorbeeld lecithine en cholesterol in een geschikt, organisch oplosmiddel, bijvoorbeeld chloroform, kunnen homogene mengsels van lipiden worden verkregen. Daarna wordt de oplossing in een reaktievat ingedampt, ter verkrijging van een lipidefilm.

De liposomen kunnen op een gebruikelijke wijze worden afgescheiden en gesteriliseerd.

In de volgens de uitvinding verkregen liposomen zal de interleukineconcentratie bij voorkeur liggen tussen ongeveer 5 en ongeveer 500 microgram per ml van de waterige fase, bij voorkeur tussen 20 en 200 microgram per ml.

De lipideconcentratie is bij voorkeur ongeveer 1 tot ongeveer 200 mg/ml van de waterige fase, in het bijzonder 10-100 mg/ml.

De gemiddelde middellijn van de liposomen voor

8501010

verder gebruik ligt bij voorkeur tussen ongeveer 25 nanometer tot 20 micron, bij voorkeur tussen 100 en 500 nanometer.

De uiteindelijke liposomen worden bij voorkeur bij lage temperatuur, bijvoorbeeld tussen -20°C en $+5^{\circ}\text{C}$, opgeslagen.

5 Teneinde hun opslagmogelijkheden te verbeteren kunnen de liposomen volgens de uitvinding tot een droog poeder worden gelyofiliseerd, bijvoorbeeld door vriesdrogen, onder toepassing van bijvoorbeeld mannitol, sucrose, polyvinyl-
10 pyrrolidon of gelatine als dragermateriaal. Dit kan onder dezelfde omstandigheden voor het vriesdrogen geschieden als hierna met betrekking tot stap Ab) is vermeld. Voor het gebruik kunnen ze weer door toevoegen van steriel water in de oorspronkelijke toestand worden teruggebracht. Ze kunnen daarna
15 met systemen die bijvoorbeeld geschikt zijn voor intraveneuze injecties of infuussen worden gemengd.

De zuiverheid van de liposomen kan volgens gebruikelijke analytische methoden worden bepaald.

Desgewenst kan een antioxydatiemiddel tot bijvoorbeeld 1 %, bij voorkeur 0,1 %, van de lipide, in de verkregen liposomen aanwezig zijn. Onder aanbevolen antioxydatiemiddelen vallen vitamine E (tocoferolacetaat),
20 vitamine C palmitaat en BHT (gebutyleerde hydroxytolueen).

Ook andere stabilisatoren voor het interleukine kunnen aanwezig zijn, bijvoorbeeld een suiker, zoals mannitol, arabinose, sorbitol of sucrose, albuminen, bijvoorbeeld menselijk serinealbumine enz. Ze kunnen voor de liposoomvorming in de buffer worden opgenomen. Bij voorkeur zijn ze in een hoeveelheid tot 20% van het molgewicht van het lipide in
25 het verkregen liposoom aanwezig.
30

Een aanbevolen werkwijze voor de liposoomvorming is de volgende werkwijze a), welke omvat:

Aa) vorming van een oplossing van een interleukine en een lipide in een organisch oplosmiddel,

35 Ab) verwijdering van het oplosmiddel van de oplos-

8501010

sing, ter verkrijging van een residu,

Ac) suspenderen van het residu in een oplossing van een buffer,

Ad) onderwerping van een suspensie aan roeren en homogenisatie, totdat liposomen worden gevormd, en

Ae) afscheiding van de liposomen.

Bij stap Aa) omvat de uitdrukking "oplossing" "pseudo"-oplossingen, zoals emulsies. Het verdient echter
aanbeveling een uniforme, heldere oplossing te bereiden.
Hierbij kan elk oplosmiddelsysteem dat het interleukine en het lipide oplost of oplosbaar maakt, worden toegepast. Het systeem kan zowel één enkel oplosmiddel als een mengsel van oplosmiddelen zijn. Het kan tot bijvoorbeeld 15 % water
bevatten. Desgewenst kan een oppervlakteactief middel aanwezig zijn. Het oplosmiddelsysteem kan elk geschikt organisch oplosmiddel bevatten, dat door verdampen van het lipide kan worden verwijderd. Een grote verscheidenheid van ethers, zoals diethylether en diisopropylether, esters, zoals ethylacetaat, alcoholen, zoals methanol en tert.butanol en gehalogeneerde koolwaterstoffen, zoals methyleenchloride en chloroform, kunnen worden aangewend. Desgewenst kan azijnzuur aanwezig zijn. Het verdient aanbeveling diethylether, methyleenchloride of tert.butanol te gebruiken.

Verder werd gevonden dat bij stap Ab) tert. butanol aanbeveling verdient indien een hoogvacuum wordt toegepast en methyleenchloride indien een laagvacuum wordt aangewend.

Bij stap Ab) kan het oplosmiddel volgens elke gebruikelijke methode worden verwijderd, waarbij rekening moet worden gehouden met de gevoeligheid van het interleukine. Onder aanbevolen methoden vallen verdampen onder een laag vacuum, bijvoorbeeld 10-50 mm Hg, of vriesdrogen onder een hoog vacuum, bijvoorbeeld lager dan 5 mm Hg, bijvoorbeeld 0,1 mm Hg.

8501010

Gevonden werd dat vooral vriesdrogen aanbeveling verdient.

5 Geschikt wordt de stap uitgevoerd bij een temperatuur lager dan kamertemperatuur en de verminderde druk en de temperatuur worden zodanig geregeld, dat het ingedampte mengsel ongeveer $1-3^{\circ}\text{C}$ koeler is dan de omgeving. Een dergelijke regeling kan op een gebruikelijke wijze geschieden. Een typerend programma voor het vriesdrogen begint bij ongeveer -60°C en de temperatuur loopt gedurende 12 uren op tot 10 -15°C . Vervolgens wordt de temperatuur tot $+10^{\circ}\text{C}$ verhoogd en daarop 2 uren gehouden.

15 Bij stap Ac) is de gebruikte buffer bij voorkeur een fosfaatbuffer, bijvoorbeeld van pH 4-7, bijvoorbeeld 5-6,5. Het verdient aanbeveling dat de waterige fase hypotoon is, bijvoorbeeld minder dan 300 mosmol/liter, in het bijzonder minder dan 290 mosmol/liter. De verkregen suspensie bevat bij voorkeur ongeveer 0,001 tot ongeveer 0,2 g lipide per ml.

20 Bij stap Ad) kan het homogeniseren geschieden door ultrasoon bestralen. Geschikte frequenties hiervoor kunnen bijvoorbeeld tussen 30 en 80 kHz liggen. Een typerend vermogen ligt tussen 200 en 400 Watt voor ongeveer 10 ml te homogeniseren of te roeren mengsel. Het verdient natuurlijk aanbeveling dat het te homogeniseren mengsel gescheiden 25 is van eventueel titaan of een ander metaal dat verbonden is met de ultrasone stralinggenerator, teneinde verontreiniging met metaal te vermijden.

30 De temperatuur ligt bij voorkeur tussen ongeveer 10 en 70°C . Voor onverzadigde lipiden verdient kamertemperatuur aanbeveling en voor verzadigde lipiden een temperatuur tussen 60 en 70°C .

Tijdens deze fase kan een emulsie van liposomen met agglomeraten worden gevormd.

35 Desgewenst kan de ultrasone bestraling worden gevolgd door roeren met een met hoge snelheid werkende mecha-

8501010

nische roerder bij bijvoorbeeld 10.000 tot 27.000 omw/min.
Het verdient echter aanbeveling deze stap weg te laten en
een roerbewerking eveneens verschaft door een ultrasoon be-
stralen, onder dezelfde omstandigheden als voor de homogeni-
satie, te hebben.

5

Bij stap Ae) kunnen de liposomen volgens de
uitvinding volgens gebruikelijke methoden worden afgescheiden,
bijvoorbeeld door ultrafiltreren, centrifugeren, ionenuitwis-
seling of gelchromatografie, dialyse enz. De liposomen kunnen
10 door een filter met geschikt kleine openingen, bijvoorbeeld
0,1-1 micron, worden gefiltreerd en gesteriliseerd. Desge-
wenst kan de filtratie boven het faseovergangspunt van het
lipide, bijvoorbeeld tussen 30 en 70 ° C, worden uitgevoerd.
Het verdient aanbeveling dat de liposomen door een met hoge
15 snelheid uitgevoerde centrifugatie, bijvoorbeeld bij 10.000-
20.000 g, worden afgescheiden.

Een voorbeeld van werkwijze a) is

a'a) mengen van een hydrofiele oplossing van
een interleukine met een lipide in een organisch oplosmid-
del,

20

a'b) verwijdering van het water en het organische
oplosmiddel door verdamping,

a'c) opnemen van het residu in een bufferoplos-
sing met een pH van 4-7 onder vorming van een suspensie,

25

a'd) onderwerping van de suspensie aan een
ultrasonè bestraling onder vorming van liposomen,
en

a'e) afscheiding van de liposomen.

30

Een ander voorbeeld van werkwijze a) is

a'a) menging van een hydrofiele oplossing van
een interleukine met lipide in een organisch oplosmiddel,

a'b) vriesdrogen van het mengsel ter ver-
krijging van een lyofilisaat,

35

a'c) suspenderen van het gevriesdroogde mengsel

8501010

in een oplossing van een buffer (pH : 4-7),

a'd) onderwerping van de oplossing aan roeren,
totdat liposomen en/of agglomeraten worden verkregen,

a'e) homogenisatie van het mengsel onder toe-
5 passing van mechanische middelen en

a'f) afscheiding van de liposomen.

Deze werkwijzen kunnen op analoge wijze als
werkwijze a) worden uitgevoerd.

10 Een ander aspect van de uitvinding verschaft
een werkwijze b) voor het bereiden van interleukine-bevattende
liposomen, welke omvat:

ba) mengen van een oplossing op waterbasis van
een interleukine en een organische oplossing van lipide,

15 bb) ultrasoon bestralen van het mengsel totdat
enige liposomen en/of agglomeraten zijn gevormd,
en

bc) winning van liposomen uit het mengsel, bij-
voorbeeld door

20 bi) verwijdering van het organische oplosmiddel
van het mengsel, onder vorming van een gel-achtige tussen-
fase, en

bii) omzetting van de gel-achtige tussenfase in
liposomen.

25 Bij stap ba) omvat de uitdrukking "oplossing"
"pseudo"-oplossingen, zoals emulsies. Het verdient echter
aanbeveling een uniforme, heldere oplossing te bereiden.
Hierbij kan elk oplosmiddelsysteem dat het lipide oplost
30 of oplosbaar maakt worden toegepast. Het systeem kan zowel
een enkel oplosmiddel als een mengsel van oplosmiddelen
zijn. Het kan bijvoorbeeld tot 15 % water bevatten. Desgewenst
is tevens een oppervlakteactief middel aanwezig.

Het oplosmiddelsysteem kan elk geschikt organisch
35 oplosmiddel bevatten dat door verdampen van het lipide kan

8501010

worden verwijderd. Een grote verscheidenheid van ethers, zoals diethylether en ^{di-}isopropylether, esters, zoals ethylacetaat, alkoholen, zoals methanol en tert.butanol en gehalogeneerde koolwaterstoffen, zoals methyleenchloride en chloroform, kan worden gebruikt.

Desgewenst kan azijnzuur aanwezig zijn. Het verdient aanbeveling tert.butanol en bij voorkeur diethylether of methyleenchloride te gebruiken.

Het interleukine kan in water doch bij voorkeur in een waterig buffersysteem met een pH van 4-7,4, bijvoorbeeld 5-6,5, worden opgelost.

Bij voorkeur is de waterige buffer hypotonisch, dat wil zeggen minder dan 300 mosmol/liter, in het bijzonder minder dan 290 mosmol/liter. Het verdient aanbeveling dat het verkregen mengsel ongeveer 0,001 tot ongeveer 0,2 g lipide per ml bevat.

Bij stap bb) kan de bestraling ultrasoon geschieden. Geschikte frequenties van een dergelijke bestraling kunnen bijvoorbeeld tussen 30 en 80 kHz liggen. Een typerend vermogen ligt tussen 200 en 400 Watt voor elke 10 ml te bestralen mengsel. Het verdient natuurlijk aanbeveling dat het te bestralen mengsel van elk titaan of ander metaal dat bij de ultrasone bestralingsgenerator betrokken is, is gescheiden, teneinde verontreiniging door het metaal te vermijden.

De temperatuur ligt bij voorkeur tussen ongeveer 10 en 70° C. Voor onverzadigde lipiden verdient kamertemperatuur aanbeveling en voor verzadigde lipiden een temperatuur tussen 60 en 70° C.

Tijdens deze fase kan een emulsie van liposomen met agglomeraten worden gevormd.

De liposomen kunnen op een gebruikelijke wijze worden gewonnen en stappen kunnen worden ondernomen om hun opbrengst te optimaliseren.

Bij stap i) wordt het organische oplosmiddel ge-

8501010

schikt onder een laag vacuum, bijvoorbeeld van 10-600 mm Hg, verwijderd, terwijl nog het meeste van de waterfase achterblijft. Bij voorkeur worden lage temperaturen, bijvoorbeeld kamertemperatuur, of een weinig verhoogde temperaturen, bijvoorbeeld tot 45° C, gebruikt.

Bij stap ii) kan de verkregen, gel-achtige tussenfase met water, desgewenst een bufferoplossing, zoals hiervoor beschreven ter bereiding van de liposomen, worden behandeld.

Een ander aspekt van de uitvinding verschaft een werkwijze c) voor het bereiden van interleukine-bevattende liposomen, welke omvat

ca) het mengen van een interleukine, een buffer op waterbasis met pH 4-8 en een lipide in een organisch oplosmiddel,

cb) het ultrasoon bestralen van de verkregen suspensie, ter bereiding van liposomen of agglomeraten, en

cc) het winnen van liposomen uit het mengsel, bijvoorbeeld door

ci) verdamping van het oplosmiddel van het mengsel, bijvoorbeeld via een gel-achtige tussenfase, en

cii) het omzetten van de gel-achtige tussenfase in liposomen.

Bij stap ca) omvat de uitdrukking "oplosmiddel" "pseudo"-oplossingen, zoals emulsies. Het verdient echter aanbeveling een uniforme, heldere oplossing te bereiden. Elk oplosmiddelsysteem kan hierbij worden toegepast dat het lipide oplost of oplosbaar maakt. Het systeem kan zowel één enkel oplosmiddel als een mengsel van oplosmiddelen zijn. Het kan tot bijvoorbeeld 15 % water bevatten. Desgewenst kan een oppervlakteactief middel aanwezig zijn. Het oplosmiddelsysteem kan elk geschikt organisch oplosmiddel dat door verdampen van het lipide kan worden verwijderd bevatten.

8501010

Een grote verscheidenheid van ethers, zoals diethylether en diisopropylether, esters, zoals ethylacetaat, alkoholen, zoals methanol en tert.butanol en gehalogeneerde koolwaterstoffen, zoals methyleenchloride en chloroform, kan
5 worden aangewend. Desgewenst kan azijnzuur aanwezig zijn. Het verdient aanbeveling diethylether, methyleenchloride of tert.butanol te gebruiken.

Het interleukine kan in poedervorm, bijvoorbeeld met een deeltjesgrootte van een geschikte maximale deeltjes -
10 grootte van 60 micron in middellijn, worden gebruikt.

Bij stap ca) is de toegepaste buffer bij voorkeur een fosfaatbuffer, bijvoorbeeld met een pH van 4-7,4, zoals tussen 4 en 7, bijvoorbeeld tussen 5 en 6,5. Bij voorkeur is de waterige fase hypotoon, dat wil zeggen minder dan
15 300 mosmol/liter, in het bijzonder minder dan 290 mosmol/liter. De verkregen suspensie bevat bij voorkeur ongeveer 0,001 tot ongeveer 0,2 g lipide per ml.

Bij stap cb) kan de bestraling ultrasoon geschieden. Geschikte frequenties van een dergelijke bestraling kunnen
20 bijvoorbeeld tussen 30 en 80 kHz liggen. Een typerend vermogen ligt tussen 200 en 400 Watt voor ongeveer 10 ml te bestralen mengsel. Het verdient natuurlijk aanbeveling dat het te bestralen mengsel van eventueel titaan of ander metaal dat bij de ultrasone bestralingsgenerator is betrokken wordt gescheiden,
25 teneinde verontreiniging met het metaal te vermijden.

De temperatuur ligt bij voorkeur tussen ongeveer 10 en 70° C. Voor onverzadigde lipiden verdient kamertemperatuur en voor verzadigde lipiden een temperatuur tussen 60 en 70° C aanbeveling.

30 Tijdens deze fase kan een emulsie van liposomen met aggregaten worden gevormd.

De liposomen kunnen op een gebruikelijke wijze worden gewonnen en stappen kunnen worden genomen teneinde optimale opbrengsten van liposomen te verkrijgen. Bij stap
35 ci) wordt het organische oplosmiddel geschikt onder een laag

8501010

vacuum verwijderd, bijvoorbeeld van een waterpomp bij bijvoorbeeld 10-600 mm Hg, terwijl nog het grootste gedeelte van de waterfase achterblijft. Het verdient aanbeveling lage temperaturen te gebruiken, bijvoorbeeld kamertemperatuur of een weinig verhoogde temperaturen, bijvoorbeeld tot 45° C.

5 Bij stap cii) kan de verkregen gel-achtige tussenproduktfase met water, desgewenst een bufferoplossing, zoals hiervoor beschreven, ter bereiding van de liposomen worden behandeld.

10 Er kan een suspensie worden gevormd. Desgewenst wordt verder verdampt, ter verwijdering van restsporen organisch oplosmiddel en zuurliposomenvorming.

De liposomen volgens de uitvinding kunnen verder volgens gebruikelijke methoden, zoals bij werkwijzestap ae) 15 beschreven, worden afgescheiden. De zuiverheid van de liposomen kan volgens gebruikelijke methoden worden bepaald.

Ter bepaling van de opname van interleukine in de liposomen, kan het ruwe mengsel voor de zuivering worden verdund en gecentrifugeerd, bijvoorbeeld 3-24 uren en de 20 hoeveelheid interleukine in de bovenstaande vloeistof worden bepaald. Van het resterende interleukine wordt dan aangenomen dat het in het liposomale sediment is opgenomen.

Bovendien kan de opname van interleukine in de gezuiverde liposomen volgens standaard vloeistofchromatografiemethoden met een grote nauwkeurigheid, zoals in de 25 hierna beschreven voorbeelden, worden bepaald.

De verdeling van de liposomen volgens de uitvinding na toediening kan eveneens volgens gebruikelijke farmacokinetische methoden, bijvoorbeeld proeven op dieren, 30 worden gevolgd. Radioactief interleukine wordt bereid door reactie van 125-jodium met interleukine of door bereiding van het interleukine uit aminozuren die radioactief zijn gemerkt, bijvoorbeeld met 35-zwavel. Dit interleukine wordt in liposomen, die uit radioactief gemerkte lipiden, bijvoorbeeld met 14-koolstof zijn bereid, opgenomen en in muizen ge- 35

8501010

injekteerd. Na 1 uur worden de muizen gedood en de hoeveelheid en het type radioactiviteit wordt in elk van de organen, bijvoorbeeld de milt, gemeten.

De liposomen volgens de uitvinding kunnen bij
5 vele toepassingen die voor interleukinen bekend zijn worden toegepast. Deze toepassingen omvatten het gebruik ter bevordering van de groei van dierlijke cellen in een cultuur en andere in vitro toepassingen en houden eveneens het therapeutische gebruik bij het behandelen van een verscheidenheid
10 van aandoeningen in.

Bij een proef die hierna als de bioonderzoekproef wordt aangeduid, wordt een interleukine bioassay bereid op basis van de van de interleukine concentratie afhankelijke stimulatie van de vermeerdering van een reeks muizen-T-
15 lymfocyten (CTLL cellen) (zie S.Gillis en med. J. Immunol. (1978), 120, blz. 2027-2032).

T-cellen van een van interleukine afhankelijke celcultuur werden gewassen ter verwijdering van IL-2 en behandeld met liposomen volgens de uitvinding en geïncubeerd
20 in een IL-2 vrij medium. De proefcellen werden daarna onderworpen aan een gebruikelijke reeks verdunningsproeven (verdunningsmedium RPMI-1640, aangevuld met 10 % foetaal kalveren-serum). De vermeerdering van de cellen na 24 uren incuberen werd gemeten tegen de toenemende liposoomconcentratie. Voor
25 elke verdunning werden $2 \cdot 10^5$ cellen gebruikt.

De vermeerdering werd gemeten door het opnemen van [^3H]-thymidine of de fotometrische MTT proef (MTT = (3'-(4,5-dimethylthiazool-2-yl)-2,5-difenylnitrazolinebromide). Het gele MTT van de levende cellen werd omgezet in het overeen-
30 komstige donkerblauwe formazan, dat na oplossen in zuur isopropanol spektrofotometrisch werd gemeten.

De verdunning van een monster die 50 % van de maximale vermeerderingssnelheid geeft werd gemeten. De activiteit van de liposomen volgens de uitvinding is ongeveer
35 1,2 tot 20 malen kleiner dan van het zuivere interleukine.

8501010

Bij voorkeur worden de lyposomen die een grotere werkzaamheid dan 1,3 ng/ml bij de hiervoor beschreven proef hebben gebruikt.

De werking kan eveneens worden bevestigd door standaard in vivo proeven voor de IL-2 werking, bijvoorbeeld
5 bij muizen met onderdrukte T-lymfocytencellen, bijvoorbeeld naakte muizen. Bij een proef worden dergelijke muizen verkregen door het dagelijks toedienen van 90 mg/kg cyclosporine A, waar-
bij na immuniseren met schaaperythrocyten (SRC) het aantal specifieke antilichaamscellen (PFC) in de milt volgens de
10 Jerne Plaque-vormende celproef werd verminderd met 80-97 %. Na i.v. injecteren van het antigeen werden de muizen verdeeld in groepen (6-7 dieren per groep) en hieraan werden IL-2 preparaten in doses die ongeveer 2-5 microgram IL-2 bevatten
door subcutane of bij voorkeur i.v. injectie tweemaal daags
15 gedurende 5 dagen toegediend. De opleving van de immuniteit van de dieren werd bepaald door meting van het aantal specifieke antilichaamscellen in de milt volgens de Jerne proef. De werking van de liposomen volgens de uitvinding is van dezelfde orde als van het niet-ingekapselende interleukine.

20 Het verdient aanbeveling de liposomen volgens de uitvinding te gebruiken bij therapeutische toepassingen van bijzonder belang op basis van de erkende immuno-regelende eigenschappen van de interleukinen, zoals bijvoorbeeld vermeld op blz. 1 van deze beschrijving, in het bij-
zonder hun toepassing bij het behandelen van aandoeningen
25 die toe te schrijven aan immunodeficienties zijn, zoals het ernstige gecombineerde immuno-deficientiesyndroom (SCIDS), het verkregen immunodeficientiesyndroom (AIDS), immunodeficientie toestanden van een oudere datum en congenitale immuno-
30 deficientie. Het interleukine kan echter eveneens worden toegepast als een anti-myotisch middel bij de behandeling van verschillende virale ziekten, zoals cytomegalovirusinfekties en Herpes virusinfekties en bij de behandeling van bacteriele
infekties, zoals tuberculose en leprose. Doseringen die voor
35 een dergelijke therapeutische toepassing van liposomen nodig

8501010

zijn zullen afhangen van bekende factoren, zoals de te behandelen ziekte, de ernst van de aandoening en de werkzaamheid en de hoeveelheid van het opgenomen interleukine enz.

5 In het algemeen zullen echter bevredigende resultaten worden verkregen indien ze in zoogdieren, bijvoorbeeld mensen, worden opgenomen in dagelijkse doseringen van het interleukine variërende van 0,1 μ g tot 30 μ g/kg lichaamsgewicht. Het intraveneus toedienen in een geschikte, steriele drager wordt in het algemeen aanbevolen.

10 Onder de grote verscheidenheid van speciale toepassingen van interleukine op basis van haar vermogen de groei van T-cellen in een cultuur te bevorderen bevinden zich die welke toepassing vinden in de diagnose en bij de bevordering van therapeutische behandelingen. Toepassing in de
15 diagnostika is gebaseerd op het bekende vermogen de aanwezigheid van bepaalde ziekten door bepaling van de mate van de in vitro groei van T-lymfocyten te bepalen na toediening van interleukine, onder gebruikmaking van de opname van radio-actief thymidine in de cellen als maatstaf. Ter ondersteuning
20 van therapeutische behandelingen, zoals tegen tumoren, kan het interleukine worden toegepast ter bevordering in vitro van de groei van T-lymfocyten verkregen van de patient of een andere vergelijkbare donor, waarna de verkregen vermeerderde lymfocyten weer in de patient worden geïnfuseerd ter
25 bevordering van de bestrijding van de ziekte. In het algemeen kan de hoeveelheid interleukine die moet worden gebruikt ter ondersteuning van de groei van T-cellen in een cultuur en andere in vitro toepassingen in het algemeen worden bepaald uit literatuurvermeldingen van de activiteit ervan en van de
30 vergelijking ervan met menselijk interleukine in dergelijke systemen en kan voor bepaalde gevallen door routinebepalingen worden geoptimaliseerd.

In de volgende voorbeelden duidt lecithine op lecithine uit sojabonen, terwijl de ultrasone bestraling van
35 50 KHz en 350 W is, tenzij anders aangegeven.

8501010

Werkwijze A

Voorbeeld A1:

Bereiding van liposomen.

5

2 mg menselijk IL-2 werden opgelost in 1 ml
azijnzuur. Afzonderlijk werd 1 g gezuiverd lecithine opgelost
in 5 ml tert.butanol. Deze twee oplossingen werden samen ge-
mengd en bij -30° C gevriesdroogd, waardoor een lyofilisaat
10 werd verkregen. Dit lyofilisaat werd opgenomen in een 0,05 M
fosfaatbuffer (pH 5) tot 10 ml, waardoor een suspensie werd
verkregen.

Deze suspensie werd in een bad gedurende 5 minuten
onderworpen aan ultrasone bestraling. Daarna werd de suspen-
15 sie in een stikstofatmosfeer gedurende 15 minuten gehomogeni-
seerd met een met hoge snelheid werkende roerinrichting bij
ongeveer 15.000 omw/min. (Type Polytrontype 10-30). De
liposome oplossing werd daarna bij een hogere temperatuur
dan het fasenoverdrachtspunt van het lecithine, bijvoorbeeld
20 20° C, door een steriel filter (0,2 micron) geperst. De ver-
kregen liposomale oplossing werd vervolgens gelyofiliseerd.
Desgewenst kan de stap met de met een hoge snelheid werkende
roerinrichting worden weggelaten en de bestraling 15 minuten
worden voortgezet, en/of de liposomen door centrifugeren
25 worden afgescheiden.

Analyse van liposomen

De liposomen volgens de uitvinding kunnen worden
30 geanalyseerd onder toepassing van gebruikelijke nauwkeurige
vloeistofchromatografie (HPLC) methoden met omgekeerde fase.

Het verdient aanbeveling gebruik te maken van
bolvorming C-8 koolwaterstofdragermateriaal, 10 micron (bij-
voorbeeld kolom RP Aquapore 20 x 4,6 mm) met ruime poriën
35 (ongeveer 300 Angström), van de Browlee Laboratories Inc.

8501010

USA).

Een aanbevolen elutiesysteem is een water/acetonitrilgradient met 0,2 % trifluorazijnzuur, bijvoorbeeld onder toepassing van twee elutiesystemen.

5

Systeem A: 50 % acetonitril in water (+ 0,1 % trifluorazijnzuur)

Systeem B: 70 % acetonitril in water (+ 0,1 % trifluorazijnzuur)

10

Typerende stromingssnelheden zijn 3 ml/min en met een systeemgradient van 100 % A tot 100 % systeem B gedurende 10 minuten. Onder dergelijke aanbevolen omstandigheden werd menselijk IL-2 met een retentietijd van ongeveer 7,5 minuten geelueerd en de hoeveelheid interleukine kan worden bepaald door op een gebruikelijke wijze de piek te integreren.

15

De liposomen volgens de uitvinding werden voor de HPLC voorbehandeld door

20

i) verdunning met een acetaatbuffer van pH 2,5 tot 4, waarna het liposome materiaal op de HPLC-kolom ontleedt onder vrijmaking van het interleukine,

25

ii) uitputtende verwijdering van liposoomexcipient uit het interleukine opgenomen in de liposomen, bijvoorbeeld water en methanol-methyleenchloride ter verwijdering van fosfolipiden en daarna injectie van de verkregen waterige oplossing die interleukine bevat,

30

iii) toepassing van een kolomomschakelingstechniek waarbij de liposomenexcipienten op een kationenuitwisselaar worden gescheiden van het interleukine opgenomen in de liposomen volgens de uitvinding. Daarna werd interleukine uit de kationenuitwisselaar geelueerd naar een kolom met omgekeerde fase, waar op een gebruikelijke wijze wordt gechromatografeerd.

35

Een geschikte kationenuitwisselingskolom heeft een

8501010

afmeting van 30 x 4,6 mm en is gepakt met 10 μ m drager (f.e. SC x 10 geleverd door Browlee Laboratories Inc. USA).

De liposomen bleken ongeveer 50% van het menselijke IL-2 te hebben opgenomen.

5

Werking en bruikbaarheid.

De liposomen bleken bij de hiervoor genoemde bioassay proef een overeenkomstige mate van werking als menselijk IL-2 zelf te hebben.

10

Voorbeeld A2:

Bereiding van liposomen (V3)

15

Men loste 0,5 mg menselijk IL-2 op in 1 ml azijnzuur. Apart hiervan loste men 500 mg lecithine (EPIKURON 145 V) op in 50 ml t.butanol. Deze twee oplossingen werden samen gemengd en gedurende ongeveer 16 uren bij -15° C gevriesdroogd, waardoor een lyofilisaat werd verkregen. Het lyofilisaat werd opgenomen in een 0,05 M fosfaatbuffer (pH 6,5) tot 10 ml, waardoor een suspensie werd verkregen.

20

De suspensie werd gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur (ongeveer 20° C) in een bad onderworpen aan een ultrasone bestraling. Vervolgens werd de suspensie bij kamertemperatuur gedurende 10 minuten gehomogeniseerd met een met grote snelheid werkende roerinrichting bij ongeveer 15000 omw/min. (Type Polytron PT 15).

25

De liposomen werden afgescheiden door vier uren bij 4° C te centrifugeren met 150000 g.

30

Voorbeeld A3:

Bereiding van liposomen.

35

Voorbeeld A2 werd herhaald met een ultrasone bestraling en een met een roerder met hoge snelheid uitge-

8501010

voerde homogenisatie bij een temperatuur van 70° C inplaats van bij kamertemperatuur. Het gebruikte lecithine was soja-fosfatide NC 95H. De centrifugatietijd bedroeg 2 uren.

5 Voorbeeld A4:

Bereiding van liposomen.

 Men mengde 0,5 mg menselijk IL-2, 450 mg lecithine
 (Epikuron 145 V) en 50 mg fosfatidylserine samen in 10 ml
10 tert.butanol en bestraalde 10 minuten bij kamertemperatuur,
 onder vorming van een oplossing. De oplossing werd ongeveer
 18 uren bij -40° C gevriesdroogd , ter vorming van een lyofili-
 saat.

 Dit lyofilisaat werd opgenomen in een 0,05 M
15 fosfaatbuffer (pH 6,3) tot 10 ml, waardoor een suspensie
 werd verkregen. De suspensie werd in een bad gedurende 10 minu-
 ten bij kamertemperatuur (20° C) onderworpen aan een ultra-
 sone bestraling en daarna, zoals beschreven in voorbeeld 2,
 gedurende 10 minuten gehomogeniseerd. De liposomen werden
20 afgescheiden door 4 uren bij 4° C te centrifugeren bij 150.000
 g.

Voorbeeld A5:

Bereiding van liposomen.

25

 Voorbeeld A4 werd herhaald onder toepassing van
 500 mg lecithine inplaats van 450 mg lecithine en 50 mg fosfa-
 tidylserine.

30 Voorbeeld A6:

Bereiding van liposomen.

 Voorbeeld A4 werd herhaald onder toepassing van
 425 mg lecithine en 75 mg cholesterol inplaats van 450 mg
35 lecithine en 50 mg fosfatidylserine.

8501010

Voorbeeld A7:

Bereiding van liposomen.

5 Voorbeeld A2 werd herhaald zonder toepassing van
de met grote snelheid uitgevoerd roerstap. Het ultrasoon
bestralen werd 15 minuten voortgezet.

Voorbeeld A8:

Bereiding van liposomen.

10

De voorbeelden A3-A6 werden herhaald zonder
toepassing van de met grote snelheid uitgevoerde roerstap.

Analyse van liposomen.

15

De bovenstaande vloeistof.

20 De na centrifugeren verkregen bovenstaande vloeistof
werd geanalyseerd met behulp van met grote nauwkeurigheid
uitgevoerde vloeistofchromatografiemethoden in de omge-
keerde fase, zoals hiervoor beschreven , en blijkt minder dan
10 % van het oorspronkelijke menselijke IL-2 te bevatten.

Biologische werking.

25

30 De liposomen werden geanalyseerd volgens de
reeks verdunningsproef bij opname van $^3\text{[H]}$ -thymidine in IL-2
afhankelijke CTLL-(16) cellen bij de hiervoor beschreven proef
(S. Gilles en med.). De IL-2 concentratie die 50 % van de
maximale groei van 10^4 cellen na 24 uren teweegbrengt, werd
onmiddellijk na de bereiding gemeten (waarde A in $\mu\text{g/ml}$).
Bij deze proef had het toegepaste menselijke IL-2 materiaal
zelf, dat als uitgangsmateriaal voor de liposomenvorming
werd toegepast, een waarde van 0,2 $\mu\text{g/ml}$.

35

8501010

Resultaten

	Voorbeeld	A ⁰ (ng/ml)	A ² (ng/ml)	A ⁴ (ng/ml)*
5	A2	0,2	0,7	3,2
	A3	9,5	8,4	no
	A4	0,7	no	no
	A5	2,6	no	no
	A6	1,6	no	no
10	A7**	1,0	no	no

* na 4 weken opslaan bij 4⁰ C, ** begin IC-2 lading: 0,8 ng/ml act.

** niet onderzocht

15

Bij de hiervoor beschreven in vivo proef werden de volgende resultaten verkregen met een opgeslagen bad van de liposomen van voorbeeld A2, die bij de hiervoor beschreven proef een in vitro aktiviteit van 1,7 ng/ml hadden:

20

		dosis in micro- grammen	PFC in de milt	aktiviteit ten opzichte van die van controle's
25	geïmmuniseerde niet-onderdruk- te muizen	-	167.000	100 %
	(Controle) onderdrukte muizen	-	28.000	17 %
30	IL-2 mate- riaal	5	111.000	66 %
	Liposomen	5	96.700	58 %
	IL-2 mate- riaal	2	96.700	58 %
	Liposomen	2	87.100	52

35

8501010

Voorbeeld A9:

Bereiding van liposomen.

Men loste 0,5 mg menselijk IL-2 op in 1 ml azijn-
5 zuur en voegde deze oplossing toe aan een oplossing van 500 mg
lecithine (Epikuron 145 V) in 50 ml methyleenchloride.

Men dampte het mengsel 1 uur bij 30° C onder
een verminderde druk tussen 10 en 50 mm Hg en daarna 3 uren
bij 50° C in, waardoor men een lipidefilm verkreeg. De film
10 werd in 10 ml van een 0,02 M fosfaatbuffer met pH 5 gedis-
pergeerd. Daarna werd de dispersie 30 minuten bij kamertem-
peratuur (20° C) in een ultrasoon bad bestraald, ter vorming
van liposomen.

De liposomen werden door 4 uren centrifugeren
15 met 15.000 g bij 40° C afgescheiden.

Voorbeeld A10:

Bereiding van liposomen.

Men herhaalde voorbeeld 9 onder ultrasone
20 bestraling bij 70° C inplaats van bij kamertemperatuur. Het
gebruikte lecithine was sojafosfatine NC 95 H. Het centrifu-
geren geschiedde gedurende 2 uren.

25 Analyse van liposomen.

Analoog aan de analyses uitgevoerd voor voorbeeld A4.

resultaten		
30 voorbeeld	A ⁰ (ng/ml)	A ² (ng/ml)
A9	0,8	0,9
A10	2,5	3,5

35

8501010

Werkwijze B

Voorbeeld B1:

Bereiding van liposomen.

5

Men loste 100 mg lecithine op in 5 ml methyleen-
chloride en bracht deze oplossing in een rondbodem. Daarna
voegde men een waterige oplossing van 0,2 mg menselijk IL-2
en 20 mg L-cysteine in 1 ml van een 0,05 M fosfaatbuffer (pH 5)
10 toe. Het mengsel werd 5 minuten bij 20° C geemulgeerd in een
ultrasoon bad (frequentie 80 kHz).

Daarna werd de emulsie (die wat gevormde
liposomen en agglomeraten bevatte) bij 20° C onder een ver-
minderde druk (20-30 mm Hg) geconcentreerd, waardoor een gel
15 werd verkregen, waaraan 2 ml van de bufferoplossing werden
toegevoegd, terwijl het mengsel langzaam werd geroerd. Aldus
verkreëg men een waterige liposomale suspensie.

De liposomen werden van het niet-opgenomen actieve
middel afgescheiden met behulp van de volgende stappen:

20

a) centrifugeren (5 minuten, 20° C, 5000 g). Het
niet-opgenomen actieve middel bleef in de bovenstaande vloeis-
stof en het liposoomsediment werd weer gesuspendeerd,

b) gelkolomchromatografie (Biogel A 1,5 of Sephadex
25 G 50). Het liposoombevattende eluaat werd geconcentreerd door
ultrafiltratie of dialyse tegen een 0,9 % natriumchloride-
oplossing.

De verkregen liposomale suspensie werd gelyofi-
liseerd.

30

Analyse

Het bleek dat in de liposomen ongeveer 50-90 %
menselijk IL-2 was opgenomen.

35

8501010

Werking en bruikbaarheid.

De liposomen bleken volgens de hiervoor genoemde
bioassay proef dezelfde mate van werking als menselijk IL-2
5 zelf te hebben.

Voorbeeld B2:

Bereiding van liposomen.

10 Men loste 500 mg lecithine (Epikuron 145 V) op
in 200 ml methyleenchloride en bracht deze oplossing in een
rondbodemkolf. Men voegde een waterige oplossing van 0,5 mg
menselijk IL-2 en 100 mg L-cysteine in 10 ml van een 0,05 M
fosfaatbuffer (pH 5) toe.

15 Het mengsel werd bij kamertemperatuur (20° C)
in een ultrasoon bad gedurende 10 minuten geemulgeerd.
De verkregen emulsie (die wat voorgevormde liposomen en agglome-
raten bevatte) werd daarna 10 minuten onder een verminderde
druk (tussen 20 en 30 mm Hg) bij 35° C geconcentreerd, waar-
20 door een gel werd verkregen waaraan 10 ml bufferoplossing werd
toegevoegd. Het mengsel werd 30 minuten geroerd bij kamer-
temperatuur.

De liposomen werden door ⁴uren centrifugeren bij
150.000 g bij 4° C afgescheiden.

25

Voorbeeld B3:

Bereiding van liposomen.

Men ging op analoge wijze als beschreven in
30 voorbeeld B2 te werk, doch voerde het concentreren 5 minuten
uit bij 80° C inplaats van 10 minuten bij 35° C. Het gebruikte
lecithine was sojafosfaat (NB 95 H). Het centrifugeren ge-
schiedde gedurende 2 inplaats van 4 uren.

35

8501010

Voorbeelden B4 en B5:

Bereiding van liposomen.

5 De werkwijze werd op analoge wijze als beschreven in de voorbeelden 2 en 3 uitgevoerd, echter zonder dat L-cysteïne aanwezig was.

Analyse van liposomen.

10 De bovenstaande vloeistof.

De na centrifugeren verkregen bovenstaande vloeistof werd geanalyseerd door de hiervoor beschreven zeer nauwkeurige vloeistofchromatografietechnieken in de omgekeerde
15 fase en bleek minder dan 10 % van het oorspronkelijke menselijke IL-2 te bevatten.

Biologische werking

20 De liposomen werden geanalyseerd volgens de reeks verdunningsproef bij de opname van $^3\text{[H]}$ -thyridine in IL-2 afhankelijke CHL-(16) cellen volgens de hiervoor beschreven proef (S. Gilles en med.). De concentratie van IL-2 die 50 % van de maximale groei van 10^4 cellen na 24 uren pro-
25 duceerde werd onmiddellijk na de bereiding (waarde A^0 in ng/ml) en na 2 weken opslaan bij 4°C (waarde A^2 in ng/ml) gemeten. Bij deze proef had het materiaal menselijk IL-2 zelf een waarde van 0,2 ng/ml.

30 Resultaten

Voorbeeld	A^0 (ng/ml)	A^2 (ng/ml)
B2	0,8	2,4
B3	20,0	35,0

35

8501010

Werkwijze C

Voorbeeld C1:

Bereiding van liposomen.

5

Men loste 50 micromol gezuiverde lecithine en 50 micromol cholesterol op in 20 ml chloroform en dampte in een stikstofatmosfeer in met behulp van een roterende verdampingsinrichting. Het residu werd opgenomen in 5 ml diethylether. Men voegde 600 microgram menselijk IL-2 (als poeder, bijvoorbeeld met een deeltjesgrootte van 5-50 micron) toe. Daarna voegde men aan deze oplossing 1,5 ml van een 0,05 molair fosfaatbuffer toe.

10

Het mengsel werd vervolgens 5 minuten bij 5° C behandeld met een ultrasone sonde, waardoor een homogenisaat werd verkregen. De verkregen emulsie werd in twee stappen geconcentreerd in een roterende verdampingsinrichting. Bij de eerste stap bedroeg de druk ongeveer 400 Torr Hg en werd daarop gehouden totdat een viskeuze gel werd verkregen. Deze gel werd behandeld met 1,5 ml van een 0,05 M fosfaatbuffer (pH 5), en de houder werd een weinig geschud, teneinde een waterige suspensie te verkrijgen. Daarna werd de waterige suspensie onderworpen aan een tweede verdampingsstap bij kamertemperatuur en normale druk gedurende 15 minuten, waardoor een niet-doorschijnende suspensie van liposomen werd verkregen.

20

25

Ter verwijdering van de laatste sporen organisch oplosmiddel kan een ultra-filtratie over een ionenuitwisselende kolom (Sephadex 650) worden uitgevoerd.

30

Analyse van liposomen.

De liposomen bleken ongeveer 50-90 % menselijk IL-2 te bevatten.

35

8501010

Werking en bruikbaarheid.

Volgens de hiervoor genoemde bioassay proef bleken de liposomen dezelfde mate van werking als menselijk IL-2 zelf te hebben.

Voorbeeld C2:

Bereiding van liposomen.

Men loste 500 mg lecithine (Epikuron 145 V) en 0,5 mg menselijk IL-2 op in 20 ml methyleenchloride en voegde 10 ml van een 0,05 molaire fosfaatbuffer toe.

Daarna werd het mengsel 5 minuten bij kamertemperatuur (ongeveer 20° C) behandeld in een ultrasoon bad. De verkregen emulsie werd 10 minuten geconcentreerd in een roterende verdampingsinrichting bij 35° C, totdat een viskeuze gel werd verkregen. Daarna voegde men 10 ml van een 0,05 M fosfaatbufferoplossing (pH 5) toe en roteerde de houder 30 minuten bij kamertemperatuur.

De liposomen werden door 4 uren centrifugeren bij 150.000 g bij 4° C afgescheiden.

Voorbeeld C3:

Bereiding van liposomen.

Voorbeeld C4 werd herhaald , waarbij echter nu 5 minuten bij 80° C inplaats van 10 minuten bij 35° C werd geconcentreerd. Het lecithine was sojafosfatisch NC 95 H. Het centrifugeren duurde 2 uren.

Analyse van liposomen.

De bovenstaande vloeistof.

De na centrifugeren verkregen bovenstaande vloeistof

8501010

stof werd door zeer nauwkeurige vloeistofchromatografie-
methoden in de omgekeerde fase, zoals hiervoor beschreven,
geanalyseerd en bleek minder dan 10 % van het oorspronkelijke,
menselijke IL-2 te bevatten.

5

Biologische werking.

De liposomen werden geanalyseerd volgens de
reeks verdunningsproef door opname van ^3H -thyridine in IL-2
10 afhankelijke CHLL-(16) cellen bij de hiervoor beschreven
proef (S. Gilles en med.).

De concentratie van IL-2 die 50 % van de maximale
groei van 10^4 cellen na 24 uren gaf werd onmiddellijk na de
bereiding (waarde A^0 in ng/ml) en na 2 weken opslaan bij 4°C
15 (waarde A^2 in ng/ml) gemeten. Bij deze proef had het materiaal
menselijk IL-2 zelf een waarde van 0,2 ng/ml.

Resultaten

20	Voorbeeld	A^0 (ng/ml)	A^2 (ng/ml)
	C2	1,2	2,9
	C3	12,5	20,0

25 Bij elk van de hiervoor beschreven voorbeelden
van de werkwijzen A, B en C kan menselijk IL-2 worden ver-
vangen door IL-2-serine 125, IL-2 A-1, IL-2 A-2, IL-2 B-1,
IL-2 B-2, IL-2 Gln 26, IL-2 Phe-121 of IL-2 Stop 121.

30

8501010

C O N C L U S I E S

1. Interleukinebevattende liposomen.
2. Liposomen volgens conclusie 1, waarin het interleukine menselijk IL-2 is.
3. Liposomen volgens conclusie 1, waarin het interleukine IL-2-serine 125 is.
4. Liposomen volgens conclusie 1, waarin het interleukine IL-2 A-1, IL-2 A-2, IL-2 B-1 of IL-2 B-2 is.
5. Liposomen volgens conclusie 1, waarin het interleukine IL-2 Gln-26, IL-2 Phe-121 of IL-2 Stop-121 is.
6. Werkwijze voor het toedienen van een interleukine aan een patient die een interleukinebehandeling nodig heeft, met het kenmerk, dat men een interleukinebevattend liposoom volgens een der conclusies 1-5 intraveneus toedient.
7. Werkwijze voor het bereiden van liposomen die interleukine bevatten, met het kenmerk, dat men
 - a) een oplossing van een interleukine met lipide in een organisch oplosmiddel bereidt,
 - b) het oplosmiddel van het residu verwijdert onder vorming van een residu,
 - c) het residu in een oplossing van een buffer suspendeert,
 - d) de suspensie onderwerpt aan roeren en homogeniseren, totdat liposomen worden gevormd, en
 - e) de liposomen afscheidt.
8. Werkwijze voor het bereiden van liposomen die interleukine bevatten, met het kenmerk, dat men
 - a) een waterige oplossing van een interleukine en een organische oplossing van een lipide mengt,
 - b) het mengsel aan een ultrasone bestraling onder-

8501010

werpt totdat enkele liposomen en/of agglomeraten zijn gevormd
en

c) liposomen uit het mengsel wint.

5 9. Werkwijze voor het bereiden van liposomen
die interleukine bevatten, met het kenmerk, dat men

a) een interleukine, een buffer op waterbasis
met pH 4-8 en een lipide in een organisch oplosmiddel mengt,

b) de verkregen suspensie ultrasoon bestraalt
onder vorming van enkele liposomen en agglomeraten,

10 en

c) liposomen uit het mengsel wint.

10. Werkwijze volgens conclusie 9, met het kenmerk,
dat de buffer een pH tussen 4 en 7 heeft.

11. Werkwijze volgens conclusie 9, met het kenmerk,
15 dat men de liposomen wint door

i) het oplosmiddel van het mengsel te verdampen
onder vorming van een gelachtige tussenfase, en

ii) de gelachtige tussenfase in liposomen om te
zetten.

12. Werkwijze volgens conclusie 8, met het kenmerk,
20 dat men de liposomen wint door

i) het oplosmiddel van het mengsel af te dampen
onder vorming van een gelachtige tussenfase, en

ii) de gelachtige tussenfase in liposomen om
25 te zetten.

13. Werkwijze voor het bereiden van liposomen
die interleukine bevatten, met het kenmerk, dat men

a) een hydrofiele oplossing van een interleukine
mengt met een lipide in een organisch oplosmiddel,

30 b) het water en organische oplosmiddel verdampt,

c) het residu opneemt in een bufferoplossing met
een pH 4-7 onder vorming van een suspensie,

d) de suspensie onderwerpt aan een ultrasone
bestraling onder vorming van liposomen, en

35 e) de liposomen afscheidt.

8501010

14. Werkwijze voor het bereiden van liposomen die interleukine bevatten, met het kenmerk, dat men

a) een hydrofiele oplossing van een interleukine mengt met een lipide in een organisch oplosmiddel,

5 b) het mengsel vriesdroogt, onder vorming van een lyofilisaat,

c) het gevriesdroogde mengsel suspendeert in een oplossing van een buffer (pH 4-7),

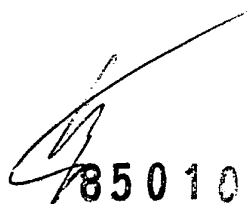
10 d) de oplossing in beweging brengt totdat liposomen en/of agglomeraten zijn gevormd,

e) het mengsel met mechanische middelen homogeniseert en

f) de liposomen afscheidt.

14. Farmaceutische preparaten die een interleukine bevattend liposoom volgens een der voorgaande conclusies bevatten.

15. Werkwijzen als beschreven in de beschrijving en/of voorbeelden.


8501010