



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 300954

(13) B1

(51) Int Cl⁶ A 61 K 9/127

Patentstyret

(21) Søknadsnr	902184	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	18.11.88, PCT/US88/03995
(22) Inng. dag	16.05.90	(85) Videreføringssdag	16.05.90
(24) Løpedag	18.11.88	(30) Prioritet	18.11.87, US, 122354
(41) Alm. tilgj.	13.07.90		
(45) Meddelt dato	25.08.97		
(73) Patenthaver	NeXstar Pharmaceuticals Inc, 2860 Wilderness Place, Boulder, CO 80301, US		
(72) Oppfinner	Eric Anton Forssen, La Canada, CA, US		
(74) Fullmektig	J.K. Thorsens Patentbureau AS, 0134 OSLO		

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for fremstilling av et fosfolipid-innesluttet kationisk, lipofilt medikamentpreparat

(56) **Anførte publikasjoner** WO 86/01102

(57) **Sammendrag**

Nye liposom-innesluttete kationiske, lipofile medikamentpreparater, f.eks. antracyklin-antineoplastiske preparater og flertrinns innesluttings-/anrikningsprosedyrer for fremstilling av disse. Fremgangsmåtene omfatter dannelse av liposomer fra fosfolipider som distearoyl-fosfatidylcholin eller et lignende fettsyre-diesterfosforlipid med lang kjede, som skal anrikes med medikamentet, f.eks. daunorubicin eller doxorubicin, i et vandig medium i nærvær av en syre, f.eks. en organisk syre som kan være en monofunksjonell pyranosidylsyre som laktobionsyre, tilsetning av medikamentet og deretter tilsetning av en base som kalsiumkarbonat hvis kationer ikke kan passere gjennom vesiklenes dobbeltlag, til å laddnings-nøytralisere de organiske syreanioner i den utvendige vandige fase og indusere laddnings-nøytralisering av de sure anioner i den innvendige vandige fase ved tiltrekning av det kationiske, lipofile medikament.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et fosfolipid-innesluttet kationisk, lipofilt medikamentpreparat.

5 Mer spesielt vedrører den foreliggende oppfinnelse en ny flertrinns innesluttings-/anrikningsprosedyre for å innlemme et hvilket som helst kationisk, lipofilt medikament som kan fordeles i et lipid-dobbeltdag, og særlig et antracyklin-antineoplastisk middel som anvendes for behandling av tumorer eller maligne tilstander i pattedyr, omfattende mennesker, i 10 liposom micellepartikler som er dannet i form av unilamellære eller multilamellære lipidvesikler. Denne nye innesluttings-/anrikningsprosedyre forenkler overføring av medikament fra lipidmembranen til det indre vannholdige rom i liposomet, og 15 øker dermed innesluttings-effektiviteten og således mengden av medikamentet som kan tilføres til kroppen, f.eks. mengden av et antineoplastisk middel som kan tilføres til tumorvev. Når det gjelder antineoplastiske midler, er andre fordeler i forbindelse med terapi med liposom-innesluttet antracyklin-antineoplastisk middel også tilveiebragt: økt stabilitet in vivo for medikament-tilførselssystemet, økt spesifisitet av 20 medikamenttilførsel til et eller flere tumorvev-steder, nedsatt kardiotoxisitet og mulighet for å produsere, og således anvende, disse medikament-tilførselssystemer i stor 25 skala.

Anvendelse av liposomer som biologisk nedbrytbare tilførsels-systemer for en rekke medikamenter, omfattende deres anvendelse for å styre antracyklin-antineoplastiske midler til 30 tumorvev, øke effektiviteten av det tilførte antracyklinmedikament og redusere dets kardiotoxisitet, er oftere og oftere beskrevet i den vitenskapelige litteratur i de seneste tyve år. Se for eksempel US patenter nr. 3.993.754, utstedt 23. november 1976 til Rahman et al; 4.217.344, utstedt 12. august 1980 til Vanlerberghe et al; 4.235.871, utstedt 25. november 1980 til Papahadjopoulos et al; 4.241.046, utstedt 23. desember 1980 til Papahadjopoulos et al; 4.263.428, utstedt 21. april 1981 til Apple et al; 4.310.505, utstedt 12. januar 1982 til Baldeschwieler et al; 4.330.534, utstedt

18. mai 1982 til Sakurai et al; 4.331.654, utstedt 25. mai 1982 til Morris; 4.356.167, utstedt 26. oktober 1982 til Kelly; 4.411.894, utstedt 25. oktober 1983 til Schrank et al; 4.419.348, utstedt 6. desember 1983 til Rahman et al;

5 4.427.649, utstedt 24. januar 1984 til Dingle et al; 4.438.052, utstedt 20. mars 1984 til Weder et al og 4.515.736, utstedt 7. mai 1985 til Deamer. Også internasjonal patentsøknad nr. PCT/US84/01431, publisert 4. mars 1985 (internasjonalt publikasjonsnr. WO 85/00968) med Mayhew

10 et al som oppfinnere; internasjonal patentsøknad nr. PCT/US84/00855, publisert 21. november 1985 (internasjonalt publikasjonsnr. WO 85/05030) med Janoff et al som oppfinnere; europeisk patentsøknad nr. 0.004.467, publisert 3. oktober 1979 med Apple et al som oppfinnere;

15 nr. 0.036.676, publisert 30. september 1981 med Hunt et al som oppfinnere; europeisk patentsøknad nr. 0.161.445, publisert 21. november 1985 med Fukushima et al som oppfinnere; europeisk patentsøknad nr. 0.198.765, publisert 22. oktober 1986 med Rahman som oppfinner, og britisk patentsøknad nr. GB

20 2.146.525A, publisert 24. april 1985 med Margalit som oppfinner. Også Ryman et al, "Possible Use of Liposomes in Drug Delivery", i "Optimization of Drug Delivery, Alfred Benzon Symposium 17" Ed. H. Bundgaard et al (Copenhagen: Munksgaard, 1982); Forssen et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, nr. 3,

25 1873-1877 (1981); Gabizon et al, Cancer Research, 42, 4734-4739 (1982) og Forssen et al, Cancer Research, 43, 548-550 (1983).

En vanlig ulempe i forbindelse med de tidligere kjente

30 metoder for fremstilling av liposom-medikamenttilførselssystemer er de lave nivåer av liposom-medikamentinnesluttethet ("effektivitet av innesluttethet") som kan oppnås ved hjelp av slike metoder. Internasjonale patentsøknader nr. PCT/US85/01501 og PCT/US85/01502, publisert 27. februar 1986

35 (WO86/01102 og WO86/01103) med Bally et al som oppfinnere, omfatter metoder som er rapportert til å gi en økning i effektivitet i forbindelse med inneslutning som nærmer seg 100 % inneslutning mens hastigheten hvorved medikamentet innføres i liposom-bæreren samtidig økes. Disse metoder

omfatter dannelse av et potensial over membranen med dannelse av en ionegradient for én eller flere ladede spesies - Na⁺/K⁺, Ca⁺⁺ og H⁺ er angitt - over liposomveggene. Konsentrasjonsgradienten, som navnet antyder, kommer som et resultat av fremstilling av liposomer med forskjellige konsentrasjoner av ladete spesies inne i ("den intern fase") og utenfor ("den eksterne fase") vesiklene. Se Ostro, Ed. "Liposomes, from Biophysics to Therapeutics" (New York: Marcel Dekker, Inc., 1987), s. 60-65.

10

Tilsetning av syrer, baser eller begge for å kontrollere pH under gjennomføring av prosessen som er utformet til å gi små unilamellære liposomer fra spesifiserte lipid-blandinger, er omtalt i US patent nr. 4.619.794, utstedt 28. oktober 1986, til Hauser. Hauser-patentet omhandler imidlertid ikke en metode for å innføre medikamenter inn i forhåndslagede vesikler.

15

Man har nå funnet at kationiske, lipofile medikamenter som er i stand til å fordele seg i et lipid-dobbeltdag kan inneslutes og anrikes, raskt og i store konsentrasjoner, i typiske liposom-medikamenttilførselssystemer ved en prosedyre som først og fremst omfatter dannelse av liposomer i et vandig medium i nærvær av en organisk syre:

25

- med minst én ioniserbar funksjonell gruppe,
- som er tilstrekkelig polar til å være svært oppløselig i vann, og
- som utviser lav permeabilitet gjennom vesikkel-membranene (dvs. en lav utstrømningshastighet fra liposomene).

30

Medikamentet som skal inneslutes kan være tilstede mens liposomene dannes eller det kan tilsettes til det liposomholdige sure, vandige medium (den eksterne fase) etter liposomdannelse, og det vil i begge tilfeller innlemmes i men ikke trenge gjennom dobbeltdaget i dette stadium av prosessen.

35

En base som vil omdanne syremolekylene i de interne og eksterne faser til de tilsvarende anioner tilsettes deretter. Denne base bør være én hvis kationer ikke kan passere gjennom liposomvesiklens lipid-dobbeltlag, og valget av en spesiell base vil også styres av det spesielle medikament som skal innesluttet. Visse baser er funnet til ikke å virke eller de virker dårligere enn andre i forbindelse med inneslutning av bestemte medikamenter, og særlig antracyklin-antineoplastiske midler.

10

Basekationene ladningsnøytraliserer syreanionene i den eksterne, vandige fase. Da basekationene imidlertid ikke er i stand til å passere gjennom lipid-dobbeltlaget, kan syreanioner i den interne, vandige fase i vesiklene, bare ladningsnøytraliseres ved kombinasjon med det kationiske medikament. Således induseres medikamentet til å passere fra membran-dobbeltlaget inn i den interne vandige fase.

15

Formålet med oppfinnelsen er å tilveiebringe en ny, flertrinns inneslutnings-/anrikningsmetode for fremstilling av liposom-innesluttede kationiske, lipofile medikamentpreparater, slik som liposom-innesluttede antracyklin-antineoplastiske preparater, som forenkler overføring av medikament fra lipid-membranen inn i det interne vandige rom i liposomet, og som dermed øker inneslutnings-effektivitet og således en økning av mengden medikament som kan tilføres til et eller flere passende steder i kroppen.

25

Oppfinnelsen vedrører således en fremgangsmåte for fremstilling av et fosfolipid-innesluttet kationisk, lipofilt medikamentpreparat, som er kjennetegnet ved trinnene:

30

a. dannelse av liposomer i et vandig medium inneholdende en syre med minst én ioniserbar funksjonell gruppe, med tilstrekkelig polaritet til å være meget oppløselig i vann og med lav permeabilitet gjennom vesikkel-membranene til å gi et surt liposomholdig vandig medium med en pH-verdi fra 2,0 til 2,5 hvori syren er tilstede i de interne og eksterne liposomfaser, idet liposomet fremstilles fra hydroksyamino(lavere)-alifatisk-substituert fosfatidylkarboksylsyre-diestere av en

35

tri- eller høyere funksjonell alifatisk polyol hvori esterdelene er avledet fra en mettet eller etylenumettet alifatisk monokarboksylsyre med minst 14 karbonatomer,

- b. tilsetning av et kationisk, lipofilt medikament til det således oppnådde sure liposomholdige vandige medium, og
- c. tilsetning av en base hvis kationer ikke kan passere gjennom liposomenes lipid-dobbeltlag, for å nøytralisere syreanioner i den eksterne vandige fase og dermed indusere innføring av det kationiske, lipofile medikament i liposomenes interne vandige fase.

Når syrer har mer enn én sur ioniserbar gruppe, ioniserer gruppene ved forskjellige pH-verdier avhengig av deres relative aciditet. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen gjør det mulig å anvende den første ionisering av disse syrer, i tillegg til en eller flere høyere ioniseringer for å innføre medikamenter i liposomer, og følgelig kan betydelig mer medikament innføres når liposomenes interne vandige fase har en initial pH-verdi mellom 2,0 og 2,5 i forhold til når den initiale pH-verdi f.eks. er mellom 4,6 og 5,5 som angitt i bl. annet WO 86/01102.

Blant de kationiske, lipofile medikamenter som kan fordeles i et lipid-dobbeltlag og som således passende kan anvendes i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse, er følgende inkludert:

	<u>Medikamentgruppe</u>	<u>Eksempler</u>
30	Lokale anestetika	Dibukain, tetrakain, prokain, klorpromazin
	Kolinergiske midler	Pilokarpin, fystostigmin, neostigmin
35	Antimalaria-midler	Klorokin, amodiakin, klorguanid, primakin, meflokin, kinin
40	Antiparkinson-midler	Pridinol, prodipin, benztropin mesylat, triheksyfenidyl hydroklorid
	Antagonister for adrener- giske reseptorer	Propranolol, timolol, pindolol

	Antiprotozo-midler	Pentamidin, kinakrin
	Antihistaminer	Benadryl, prometazin
5	Biogene aminer	Dopamin, seratonin, epinefrin
	Generelle analgetika	Kodein, meperidin, metadon, morfin
10	Antikolenergiske midler	Atropin, decyklomin, metixen, propantelin
	Antidepressiva	Imipramin, amitriptylin, doxepin, desipramin
15	Antiarytmi midler	Kinidin, propranolol, lidokain
	Antiemetika	Klorpromazin, prometazin, perfenazin
20		

Ostro, op. cit, s. 64.

- Kationiske antracyklin-forbindelser med antineoplastisk aktivitet overfor cancerholdig vev eller celler, omfattende daunorubicin (også kjent som daunomycin), doxorubicin (også kjent som adriamycin), aklacinomycin A, vinblastin, vinkristin, mitomycin C og lignende, er særlig foretrukne for inneslutning i liposom-micellepartikler ved anvendelse av den nye flertrinns innesluttings-/anrikningsprosedyre i henhold til oppfinnelsen. Strukturelt inneholder disse antracyklinforbindelser et hydrofobt tetracyklin-ringsystem som er koblet til et aminosukker gjennom en glykosidbinding.
- Biologiske lipider hvorfra liposom-dobbeltlag-membranpartikler eller -vesikler som kan anvendes for utførelse av oppfinnelsen kan fremstilles, er amfifatiske (med en hydrofob og en hydrofil del) molekyler som kan aggregeres spontant til å danne små kuler, ellipsoider eller lange sylindere, eller dobbeltlag med to eller flere parallelle lag av amfifatiske molekyler. I et vandig (polart) medium, vil de polare ender av de amfifatiske molekyler som utgjør ett lag, orientere seg utover til å strekke seg inn i det omgivende medium, mens de ikke-polare hale-ender av disse molekyler likeledes assosierer med hverandre. Dette gir en polar overflate og en ikke-polar kjerne i vesikkelveggen. Slike dobbelt-miceller

er vanligvis i form av unilamellære (med ett dobbeltlag) eller multilamellære (med flere vesentlig konsentriske dobbeltlag) sfæriske vesikler med et internt, vannholdig område.

5

Liposom-dobbeltlag-membran-partikler som er funnet til å være passende for gjennomføring av oppfinnelsen, er små [f.eks. fra 30 til 150 nanometer (nm), og foretrukket fra 45 til 60 nm, i diameter som for eksempel bestemt ved anvendelse av en lyssprednings-partikkelmåler] nøytrale (ikke-ladet eller med avbalansert ladning, dvs. zwitterioner) unilamellære eller multilamellære fosfolipid-vesikler eller liposomer som er konstruert til å maksimalisere inneslutting/innlemmelse av et kationisk, lipofilt medikament ved hjelp av fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen og til å indusere spesifisitet og vev/celle-målsøking, og derved maksimalisere opptak av det resulterende liposom-medikamenttilførselssystem.

Liposomer som er passende for anvendelse ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen fremstilles fra karboksylsyre-diestere av alifatiske trioler og høyere polyoler, som glycerol, sorbitol, mannitol og lignende, idet glycerol er foretrukket, eller av spingosin eller andre aminoalkoholer inneholdende lange, umettede hydrokarbonkjeder, f.eks. dialkyl-amfifiler som spingomyelin og lignende, hvori esterdelen er avledet fra mettede eller etylenumettede (fra én til fire, og foretrukket én eller to umettede seter pr. kjede) alifatiske monokarboksylsyrer (fettsyrer med lange kjeder) med fra minst 14 til 30 karbonatomer, og foretrukket fra 18 til 24 karbonatomer, som palmitinsyre, stearinsyre, 10-metylstearinsyre, lignocersyre, palmitolsyre, oleinsyre, linolsyre, fytansyre og arachidonsyrer og lignende, og hvori én eller flere, foretrukket én, av polyolens hydroksygrupper er substituert med en fosfatergruppe som selv vil være substituert med lavere alifatiske di- eller høyere funksjonelle forbindelser, generelt lavere alifatiske forbindelser med hydroksyl- eller amino-grupper (omfattende substituert amino, f.eks. lavere alkyl-substituert amino), eller begge, som etanolamin, cholin, serin, inositol, og lignende.

Slike liposom-dobbeltlag-membran-partikler omfatter dem som er fremstilt fra dipalmitoyl-fosfatidylcholin, distearoyl-fosfatidylcholin, dioleoyl-fosfatidyletanolamin, distearoyl-fosfatidylserin, dilinoleoyl-fosfatidylinositol, distearoyl-
5 fosfatidylglycerol, og lignende, eller blandinger derav. Liposom-dobbeltlag-membran-partikler som helt utgjøres av nøytrale fosfolipider, som distearoyl-fosfatidylcholin, og foretrukket dem som er ytterligere stabilisert med kolesterol eller likevirkende substanser, for eksempel i et molforhold
10 av distearoyl-fosfatidylcholin: kolesterol på omtrent 2:1, er funnet å være særlig passende med hensyn til målsøkingseffektivitet når de anvendes for tilførsel av antracyklin-antineoplastiske midler.

15 Disse liposomer er fremstilt ved generelt kjente teknikker, som ultralydmetoden som er beskrevet i Mauk et al, Anal. Bioc. 94, 302-307 (1979) eller ved mikroemulgering ved anvendelse av prosedyren som er beskrevet i den samtidige US patentsøknad med nr. 696.727, innsendt 31. januar 1985 i
20 navnet R. Gamble. Homogenisering ved anvendelse av en ultralyd-anordning gjennomføres generelt fra 30 sekunder til ett minutt pr. milliliter suspensjon. Etter homogenisering, sentrifugeres suspensjonen ved fra 5000 xg til 20 000 xg, og foretrukket ved 5000 xg, i fra 5 til 20 minutter, foretrukket
25 omtrent 10 minutter, ved omgivelsestemperatur (vanligvis omtrent 22°C), hvoretter den filtreres gjennom et sterilt filter med liten porediameter, f.eks. et 0,2-0,45 mikron porefilter. Disse to trinn (sentrifugering og filtrering) fjerner store partikkelformede substanser som ususpenderte
30 lipider, store vesikler og andre eventuelle kontaminerende partikler.

Syren som anvendes for fremstilling av liposomer vil, som nevnt over, være en som har minst én ioniserbar, funksjonell
35 gruppe, foretrukket minst én karboksylgruppe, med tilstrekkelig polaritet til å være svært oppløselig i vann (en oppløselighet på minst 0,01 molar, og foretrukket mer enn 0,10 molar) og som utviser lav permeabilitet eller utstrøm-

mingshastighet fra liposomene dannet ved dens tilstedeværelse.

Permeabilitet eller utstrømming kan måles ved å separere
5 vesiklene fra det material som har strømmet ut, ved anvendelse av metoder som gelpermeasjonskromatografi, dialyse, ultrafiltrering eller lignende, og analyse av material som har strømmet ut på kjent måte. Permeabiliteter som strekker seg fra én til ti prosent av det opprinnelige innesluttete
10 material over en periode på omtrent 24 timer eller lengre, og foretrukket mindre enn omtrent én prosent av det opprinnelige innesluttete material over en periode på omtrent 24 timer eller lengre, er aksepterbare i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse.

15

Syrene som generelt kan anvendes ved utførelsen av oppfinnelsen er dem som ikke vil hydrolysere lipidene i vesikkelpreparatet, og omfatter organiske syrer, f.eks. monofunksjonelle pyranosidylsyrer som glukuronsyre, gulonsyre, glukonsyre, galakturonsyre, glukohexuronsyre, aktobionsyre, og
20 lignende, α -hydrokso-polykarboksylsyrer som sitronsyre, isositronsyre, hyaluronsyre, karboksypolymetylener, og lignende, aminosyrer som glutaminsyre, asparaginsyre, karboksyparginsyre, karboksylglutaminsyre, og lignende, mettede og umettede,
25 usubstituerte og substituerte alifatiske dikarboksylsyrer som ravsyre, glutarsyre, ketoglutarsyre, vinsyre, melkesyre, maleinsyre, fumarsyre, glutarsyre, malonsyre, og lignende, fosforholdige organiske syrer som fytinsyre, glukosefosfat, ribosefosfat, og lignende, og uorganiske syrer, f.eks.
30 sulfonsyre, svovelsyre, fosforsyre, polyfosforsyrer, og lignende.

Pyranosidylsyrene er funnet til å være de mest effektive for innføring av antracyklin-antineoplastisk middel ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen, etter som doxorubicin,
35 som vanskeligere lar seg inneslutte ved hjelp av denne metode enn daunorubicin, lett innesluttet ved hjelp av laktobionsyre og galakturonsyre men ikke med eddiksyre. Sitronsyre er også funnet til å inneslutte doxorubicin, men de oppnådde anrikede

vesikler viste seg overraskende å være langt giftigere enn medikamentet i fri form. I nesten alle tilfeller av vesikkel-innesluttet doxorubicin som er angitt i litteraturen, er de anrikede vesikler mindre giftige enn medikamentet i fri form.

Basen som vil omdanne syremolekylene i de interne og eksterne vandige faser til de tilsvarende anioner bør, som nevnt over, være en hvis kationer ikke kan passere gjennom vesiklenes lipid-dobbeltdag. Slike baser omfatter alkali- og jordalkalimetall-hydroksyder, karbonater og lignende forbindelser, f.eks. natrium-, kalium-, litium-, kalsium- og magnesiumhydroksyder og karbonater, og aminer som nimetylglukamin, etylendiamin og Tris-base [også kjent astrometamin, 2-amino-2-hydroksymetyl-1,3-propandiol og tris(hydroksymetyl)aminometan], hvor alle har en høy vannoppløselighet, større enn 0,01 molar, og har lav oppløselighet, mindre enn 0,01 mMolar, eller er uoppløselige i organiske oppløsningsmidler som etanol, kloroform, dietyleter og etylacetat.

20

Som i tilfellet med syren, er visse baser som oppfyller kriteriet med at de har kationer som ikke kan passere gjennom vesiklenes lipid-dobbeltdag, funnet til å være mer effektive enn andre for anrikning av antracyklin-antineoplastisk middel ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen. Karbonater, slike som kalsiumkarbonat, natriumkarbonat, natriumbikarbonat, og lignende er funnet til å virke i alle tilfeller, omfattende doxorubicin som er vanskelig å inneslutte. Basiske hydroksyder, som natrium-, kalium- og kalsiumhydroksyd, og aminer, omfattende etylendiamin, Tris og N-metylglukamin var alle lite effektive for innføring av doxorubicin i vesiklene ved hjelp av fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen.

35 Ved utførelsen av fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen blir vesiklene, f.eks. som tørre pulvere dersom de lagres i denne tilstand, først dispergert i et vandig medium ved en temperatur fra 40°C til 80°C, foretrukket fra 50°C til 70°C, med en vesikkel-konsentrasjon fra 5 mg/ml til 100 mg/ml og

foretrukket fra 20 mg/ml til 40 mg/ml. Vann alene, som foretrukket, skjønt ikke nødvendigvis er deionisert (små anioner som klorid, som lett kan passere gjennom dobbeltlag-membranen kan interferere med innesluttings-/anriknings-prosedyren) kan anvendes, eller andre avioniske medier som de vandige sukkeroppløsninger angitt i den samtidige US patent-søknad med nr. 787.535, innsendt 15. oktober 1985 i navnet Eric Forssen.

- 10 Som nevnt over kan kolesterol og likevirkende substanser, f.eks. andre steroler, zwitterioniske eller ladede lipider, og lignende, tilsettes om ønsket til den vandige vesikkel-dispersjon for ytterligere å forbedre stabiliteten av de medikament-anrikede vesikler som deretter dannes. Slike
15 substanser tilsettes vanligvis i mengder fra 0,1 til 50 mol%, og foretrukket fra 5 til 33 mol%, basert på totalmengden av komponentene i dobbeltlag-membranen.

Den valgte syre som anvendes for fremstilling av det vandige
20 vesikkel-holdige medium vil være tilstede under hydratisering og homogenisering (f.eks. ultralydbehandling) og før tilsetning av medikamentet som skal innesluttet, og vil anvendes i konsentrasjoner fra 10 mMolar (millimolar) til 300 mMolar, og foretrukket fra 50 mMolar til 200 mMolar, idet suspen-
25 sjonen holdes ved en temperatur fra 30°C til 70°C og foretrukket fra 50°C til 60°C under dette trinn.

Medikamentet, f.eks. et antracyklisk antineoplastisk middel, tilsettes til det sure, vandige vesikkel-holdige medium enten
30 som et tørt pulver eller foretrukket som en konsentrert løsning i vann, i mengder fra 1 mg/100 mg lipid til 10 mg/100 mg lipid, foretrukket fra 1 mg/20 mg lipid til 1 mg/30 mg lipid, for å sikre en inneslutning på så nær 100 % som mulig. Den temperatur hvorved medikamentet tilsettes vil
35 generelt være over vesikkel-faseoverføringstemperaturen, f.eks. en temperatur fra 40°C til 80°C og foretrukket fra 50°C til 65°C, for å forenkle diffusjon av medikamentet inn i vesiklene, og den medikament-holdige suspensjon vil fore-

trukket holdes ved denne temperatur under den påfølgende basetilsetning.

Den valgte base tilsettes til den medikament-holdige sure
5 vesikkel-suspensjon i mengder fra én-sjettedels molekvivalent
til én molekvivalent, basert på netto ionisering av syren og
den ønskede endelige pH-verdi. I tilfellet med suspensjoner
som inneholder antracyklin-antineoplastisk middel, vil van-
ligvis en pH fra 4,5 til 6,0 oppnås. Basetilsetning gjennom-
10 føres vanligvis mens oppvarmingen av blandingen fortsettes,
f.eks. ved en temperatur fra omtrent 40°C, over en periode
fra ett til ti minutter, foretrukket under omrøring av blan-
dingen til å gi hurtig og inngående blanding. Etter basetil-
setning fortsettes vanligvis oppvarmingen i ytterligere 5 til
15 20 minutter, foretrukket omtrent 10 minutter.

De tidsperioder som hvert av disse fremgangsmåte-trinn og den
totale innesluttings-/anrikningsprosedyre gjennomføres innen-
for er imidlertid ikke kritiske. Totalt vil hele prosedyren
20 omfattende påfølgende bearbeidingsprosedyrer for å klargjøre
medikament-tilførselssystemene for parenteral tilførsel,
f.eks. for human intravenøs injeksjon eller for lagring
inntil bruk, vanligvis ta fra 30 til 120 minutter.

25 Slike bearbeidingsprosedyrer kan først og fremst omfatte
fjerning av syren eller andre anioner fra det vandige miljø
utenfor liposomene og dennes erstatning med f.eks. en vandig
oppløsning av sukker, f.eks. en oppløsning som inneholder fra
5 til 20 vekt% av et biologisk tålbart mono-, di- eller
30 trisakkarid som er forenelig med de medikament-holdige
vesikler, som laktose, dekstrose, sukrose, trehalose,
raffinose, maltose, eller lignende, eller en oppløsning
inneholdende en ikke-sakkarid polyol som glycerol, inositol,
sorbitol, mannitol, eller lignende, og som også inneholder
35 fra 0,1 til 2 vekt% av et hjelpestoff som glycin, trometamin,
n-metylglukamin, og lignende, som virker som en buffer.
Fjerning av syren eller andre anioner fra det eksterne van-
dige medium kan gjennomføres ved anvendelse av gelpermea-
sjonskromatografi, ultrafiltrering, vakuumbdialyse, tangen-

tialfiltrering, hulfiberfiltrering eller lignende metoder, idet gelpermeasjonskromatografi foretrekkes for produktvolumer på 100 ml eller mindre og tangentialfiltrering for volumer over 100 ml.

5

Erstatning av syren etterfølges vanligvis av sentrifugering og konsentrering, idet det igjen anvendes vakuumdialyse, ultrafiltrering, tangentialfiltrering eller andre metoder til å fjerne vann og vannoppløselige forbindelser mens lipidvesiklene og deres innhold beholdes.

For at den fagkyndige på området bedre skal forstå den foreliggende oppfinnelse, er følgende eksempler angitt. Alle deler og prosentdelar er uttrykt i vektdeler og vekt%, dersom annet ikke er angitt.

Eksempel I

Inneslutting av daunorubicin i distearoyl-fosfatidylcholin-kolesterolvesikler ved anvendelse av sitronsyre og natriumhydroksyd.

Et tørt pulver inneholdende en homogen dispersjon av kolesterol i distearoylfosfatidylcholin i et molforhold på 1:2 fremstilles. Denne dispersjon hydratiseres deretter med en vandig oppløsning inneholdende 4 1/2 % laktose (ekvivalent med 125 mMolar) og 50 mM sitronsyre ved en pH på 2,0 til 2,5 (ikke innstilt). Lipidkonsentrasjonen i den oppnådde suspensjon er 20 mg pr. ml. Denne blanding oppvarmes til 65°C og en mengde daunorubicin tilsettes i form av en konsentrert oppløsning i vann tilstrekkelig til å gi en endelig daunorubicin-konsentrasjon på omtrent 1,0 mg/ml. Deretter, under fortsatt oppvarming av blandingen, tilsettes en mengde natriumhydroksyd som er lik to og en halv molekvivalenter pr. mol sitronsyre til blandingen over en tidsperiode på omtrent tre minutter. Suspensjonen omrøres deretter kraftig til å gi hurtig og inngående blanding.

Etter tilsetning av natriumhydroksyd, inkuberes blandingen ved den samme temperatur i omtrent 10 minutter. Ved dette

trinn i prosedyren, har daunorubicin trengt gjennom dobbeltlag-membranen til det indre av vesikkelen og dannet et salt med citrat som mot-ion. Etter inkubasjonsperioden, avkjøles blandingen til omgivelsestemperatur og sentrifugeres som

5 beskrevet over. Deretter byttes den eksterne vandige fase, inneholdende citrat- og natriumioner sammen med eventuelt daunorubicin som ikke er innesluttet, med en oppløsning av 9 % laktose i vann med 50 mMolar glycin ved gelpermeasjonskromatografi.

10

Deretter gjennomføres tangentialfiltrering som fjerner vann og vannoppløselige forbindelser mens lipid-vesiklene og deres innhold beholdes. Dette konsentrerte produkt steriliseres deretter ved filtrering gjennom filtere med porødiometer 0,45

15 mikron. Den endelige lipid-vesikkelsuspensjon inneholdende innesluttet daunorubicin kan deretter anvendes direkte eller den kan lagres i fire uker eller mer i frossen tilstand eller ved fra 4°C.

20 Eksempel II

Prosedyren i eksempel I gjentas på alle avgjørende punkter unntatt følgende:

- natriumhydroksyd erstattes med en ekvivalent mengde

25 natriumbikarbonat;

- en ekvivalent mengde vinsyre anvendes i stedet for sitronsyre;
- utbyttingsprosedyren gjennomføres med en vandig 11 %

30 laktoseoppløsning i stedet for den vandige 9 % laktose/50 mMolar glycinoppløsningen.

En lipidvesikkel-suspensjon inneholdende innesluttet daunorubicin oppnås igjen.

35

Eksempel III

Inneslutning av doxorubicin ved anvendelse av distearoyl-fosfatidylcholin, kolesterol, laktobionsyre og kalsiumkarbonat.

Et tørt pulver inneholdende en homogen dispersjon av kolesterol i distearoyl-fosfatidylcholin i et molforhold på 1:2 fremstilles. Denne dispersjon hydratiseres deretter med en vandig oppløsning av 200 mMolar laktobionsyre i vann

5 (71,66 g/l) med en pH fra 2,0 til 2,5 (ikke innstilt).

Lipid-konsentrasjonen i den oppnådde suspensjon er omtrent 20 mg/ml. Blandingen oppvarmes deretter til 70°C. Blandingen homogeniseres deretter, sentrifugeres og filtreres som beskrevet i ovennevnte eksempel I.

10

Etter at suspensjonen av små, unilamellære vesikler i 200 mMolar laktobionsyre er fremstilt, oppvarmes den til 65°C og en mengde doxorubicin tilsettes deretter, som en konsentrert oppløsning i vann, som vil resultere i en endelig

15 doxorubicinkonsentrasjon på omtrent 1,0 mg/ml. Deretter, under fortsatt oppvarming av blandingen, tilsettes kalsiumkarbonat som et tørt pulver i en mengde som er ekvivalent med omtrent 20 g/l. Oppvarmingen fortsettes i ytterligere 10 minutter med kraftig omrøring av blandingen. Deretter

20 sentrifugeres blandingen for å fjerne overskudd av kalsiumkarbonat og andre utfelte materialer. De påfølgende bearbeidingstrinn er som beskrevet i eksempel I over.

En lipid-vesikkelsuspensjon inneholdende innesluttet

25 doxorubicin oppnås.

Eksempel IV

Hver viktige detalj i prosedyren i eksempel III over gjentas unntatt følgende:

30

- galakturonsyre anvendes i stedet for laktobionsyre;
- kalsiumkarbonat erstattes med natriumkarbonat.

En lipid-vesikkelsuspensjon inneholdende innesluttet

35 doxorubicin oppnås.

Eksempel V

Hver viktig detalj i prosedyren i eksempel III over gjentas med unntak av én. Distearoyl-fosfatidylglycerol, kolesterol

og distearoyl-15-fosfatidylcholin inkluderes i vesikkel-dob-
beltlaget i et molforhold på henholdsvis omtrent 1,5:5:10.

En lipid-vesikkelsuspensjon inneholdende innesluttet doxo-
5 rubicin oppnås.

Eksempel VI

Daunorubicin-vesikler, fremstilt som beskrevet i eksempel I
over, ble lagret i frossen tilstand, nedkjølt ved 4°C eller
10 ved romtemperatur (22°C). Ved to og fire uker ble prøver
målt for: 1) kjemisk stabilitet av medikamentet og lipid-
komponentene, 2) retensjon av medikament i vesiklene, og 3)
biologisk aktivitet målt ved antitumor-aktivitet (kun to
uker). Ingen signifikant nedbrytning eller tap av medikament
15 eller av vesikkellipider kunne påvises etter fire uker. Det
synes heller ikke å være betydelig utstrømning, unntatt for
en eventuelt omtrent 5 % utstrømning av medikament fra frosne
og tinede vesikler. Biologisk aktivitet var større enn hos
nylaget fri daunorubicin og litt mindre enn (4°C) hos ny-
20 lagede vesikler.

Eksempel VII

Antitumor-aktivitet av daunorubicin-vesikler.

25 Daunorubicin-vesikler fremstilt som beskrevet i eksempel I
over er utprøvd mot P-1798 lymfosarkom og Mal6c bryst-adeno-
karsinom, begge faste tumorer i mus. Undersøkelsene med
Mal6c-tumoren er fremdeles under utførelse, mens undersøkel-
sene av P-1798-tumoren er gjennomført. Behandling på alle
30 dosenivåer, fra 10 mg/kg til 50 mg/kg, har vist at når dauno-
rubicin-vesiklene er utformet som beskrevet over har de en
større antitumor-aktivitet og mindre toksisitet enn medika-
mentet alene, som bestemt ved økt levetid og redusert tumor-
størrelse.

35

Eksempel VIII

Biologisk aktivitet av doxorubicin-vesikler.

Doxorubicin-vesikler fremstilt som beskrevet i eksempel III og IV er undersøkt med hensyn til toksisitet og antitumor-aktivitet. Disse undersøkelser pågår fremdeles, men noen resultater og konklusjoner er imidlertid nå klare.

5

Behandling av CD2F1-mus har indikert at den maksimale tolererte dose (MTD, ikke-dødelig) av en enkel intravenøs dose av det frie medikament, doxorubicin-hydroklorid er omtrent 25 mg/kg. Dette er til sammenligning med en MTD på omtrent 40 mg/kg (normalisert til hydrokloridet) for doxorubicin-vesikler fremstilt som beskrevet i eksempel III. I motsetning til dette, var MTD for doxorubicin-vesikler, fremstilt som beskrevet i eksempel III med det unntak at laktobionsyre var erstattet med sitronsyre, bare omtrent 10 mg/kg, dvs. mindre enn MTD for det frie medikament.

Doxorubicin-vesikler fremstilt med laktobionsyre har vist mindre toksisitet som målt ved undertrykkelse av hvite blodlegemer og ved overlevelse ved høye doser, sammenlignet med det frie medikament.

Telling av hvite blodlegemer ble gjennomført på CD2F1-mus som mottok doxorubicin-doser på 40 mg/kg (for det ekvivalente hydroklorid). Mus som mottok det frie medikament fikk en alvorlig nedsettelse av antall hvite blodlegemer: fire døgn etter terapi var antallet kun 8,5 % av verdiene før terapi. I motsetning til dette, fikk mus som var behandlet med doxorubicin-vesikler fremstilt i overensstemmelse med oppfinnelsen (eksempel III) ved samme doxorubicin-dose, kun en moderat nedsettelse av antall hvite blodlegemer: fire døgn etter terapi var antallet 75 % av verdiene før terapi.

Doxorubicin-vesikler kan også fremstilles med sitronsyre. Intravenøse tester i mus har imidlertid vist at mens doser av fritt medikament på 20 mg/kg tolereres, er ekvivalente doser av doxorubicin-citrat i vesikler dødelig toksiske.

PATENTKRAV

- 5 1. Fremgangsmåte for fremstilling av et fosfolipid-inneslut-
tet kationisk, lipofilt medikamentpreparat,
k a r a k t e r i s e r t v e d trinnene:
a. dannelse av liposomer i et vandig medium inneholdende en
syre med minst én ioniserbar funksjonell gruppe, med til-
10 strekkelig polaritet til å være meget oppløselig i vann og
med lav permeabilitet gjennom vesikkel-membranene til å gi et
surt liposomholdig vandig medium med en pH-verdi fra 2,0 til
2,5 hvori syren er tilstede i de interne og eksterne liposom-
faser, idet liposomet fremstilles fra hydroksyamino(lavere)-
15 alifatisk-substituert fosfatidylkarboksylsyre-diestere av en
tri- eller høyere funksjonell alifatisk polyol hvori ester-
delene er avledet fra en mettet eller etylenumettet alifatisk
monokarboksylsyre med minst 14 karbonatomer,
b. tilsetning av et kationisk, lipofilt medikament til det
20 således oppnådde sure liposomholdige vandige medium, og
c. tilsetning av en base hvis kationer ikke kan passere
gjennom liposomenes lipid-dobbelthlag, for å nøytralisere syr-
eanioner i den eksterne vandige fase og dermed indusere
innføring av det kationiske, lipofile medikament i liposome-
25 nes interne vandige fase.
2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte syre er en
organisk syre.
30
3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 og 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte syre er lakto-
bionsyre.
- 35 4. Fremgangsmåte som angitt i krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte organiske syre
er en polykarboksylsyre.

5. Fremgangsmåte som angitt i krav 1-4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte base er et
alkali- eller jordalkalimetallhydroksyd eller karbonat.

5 6. Fremgangsmåte som angitt i krav 1-5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at syren og andre anioner
fjernes fra det vandige miljø utenfor liposomene og erstattes
med en vandig sukkeroppløsning etter tilsetning av basen.

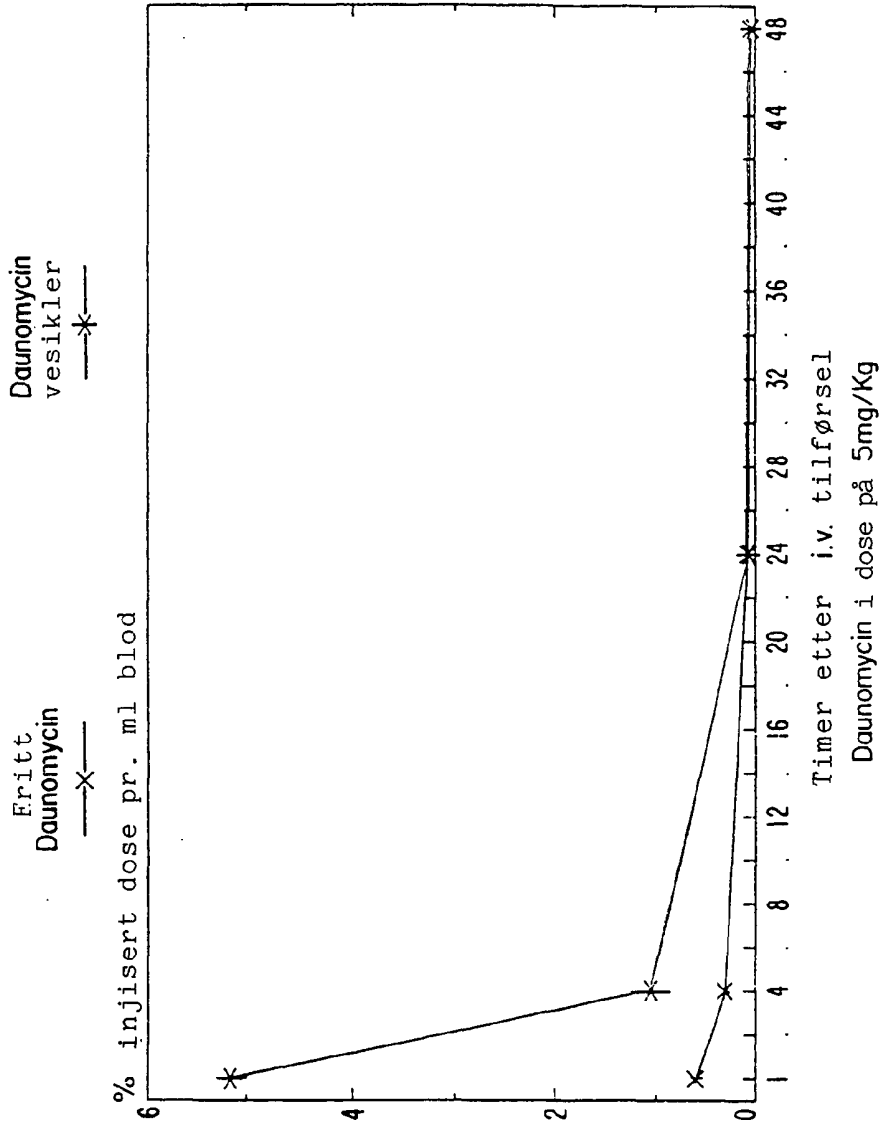
10 7. Fremgangsmåte som angitt i krav 1-6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte kationiske,
lipofile medikament er et antracyklin-antineoplastisk middel.

8. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte syre er sitron-
syre, nevnte base er natriumhydroksyd, nevnte diester er
distearoyl-fosfatidylcholin, nevnte kationiske, lipofile
medikament er daunorubicin, og kolesterol er tilstede i
liposom-dobbeltlagene som en stabilisator.

20

9. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte syre er lakto-
bionsyre, nevnte base er natriumhydroksyd, nevnte diester er
distearoyl-fosfatidylcholin, nevnte kationiske, lipofile
25 medikament er doxorubicin, og kolesterol er tilstede i
liposom-dobbeltlagene som en stabilisator.

DAUNOMYCIN BIOFORDELING: fritt og vesikkel-innesluttet
Blodnivåer, av C-14 Daunomycin *

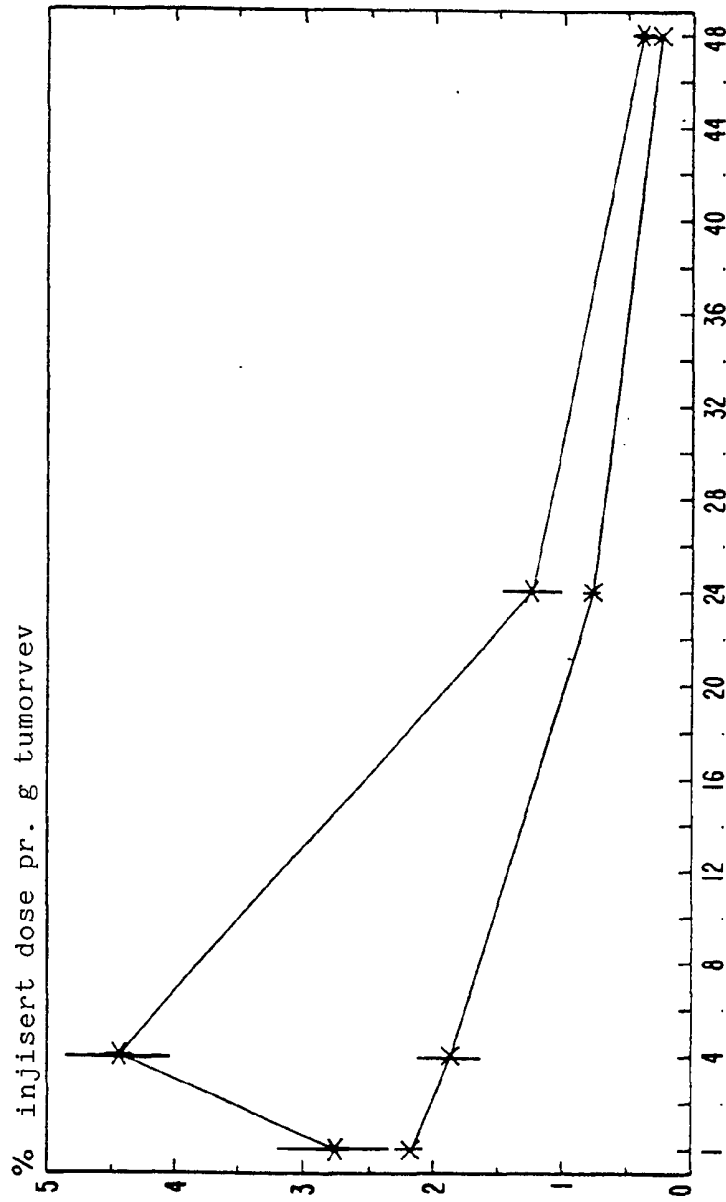


* I fig. 1-8 er antracyklin-midlet daunorubicin merket "daunomycin".

Fig. 1.

DAUNOMYCIN BIOFORDELING: fritt og vesikkel-innesluttet
Tumornivåer av **C-14 Daunomycin**

Fritt Daunomycin —x—
Daunomycin vesikler —*—

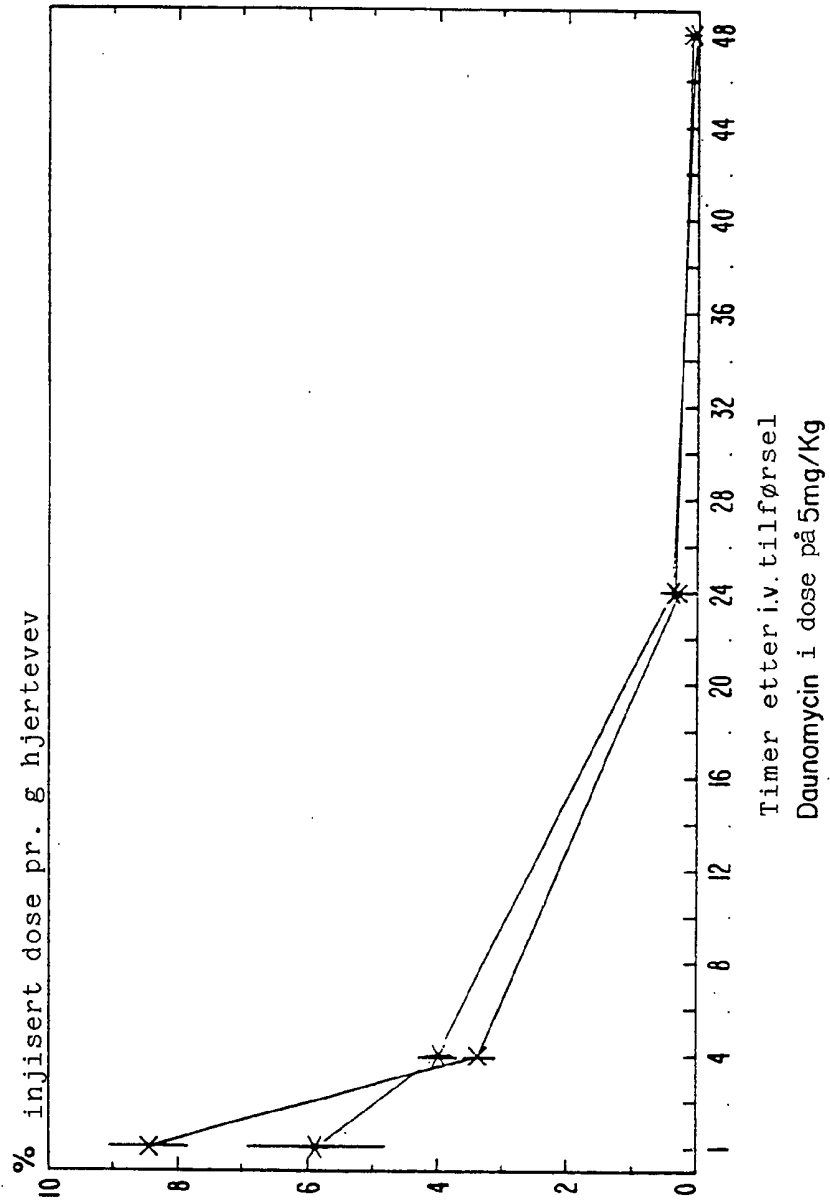


Timer etter i.v. tilførsel
Daunomycin i dose på 5mg/Kg

Fig. 2.

DAUNOMYCIN BIOFORDELING: fritt og vesikkel-innesluttet
Hjertenivåer av C-14 Daunomycin

Fritt Daunomycin —X—
Daunomycin vesikler —*—

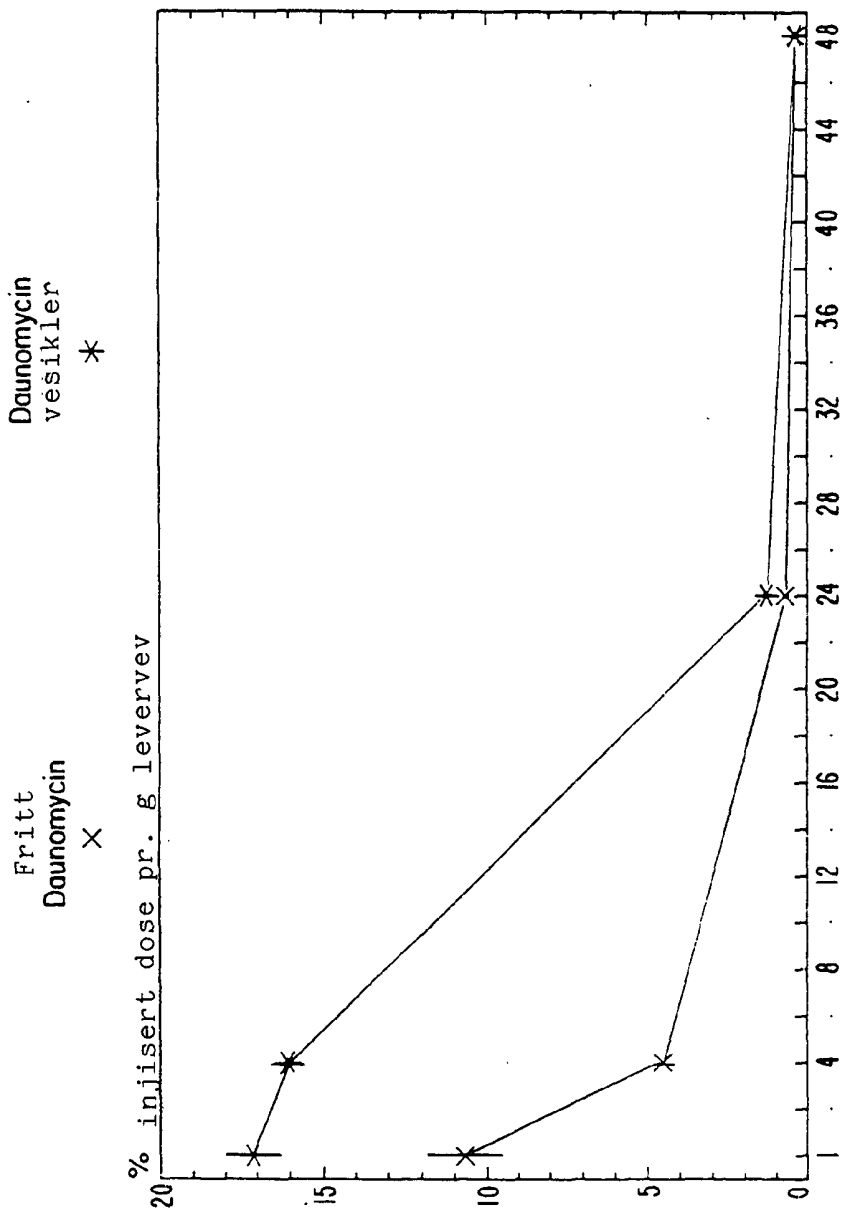


Daunomycin i dose på 5mg/Kg

300954

Fig. 3.

DAUNOMYCIN BIOFORDELING: fritt og vesikkel-innesluttet
 Levernivåer av C-14 Daunomycin



Timer etter iv. tilførsel

Daunomycin i dose på 5mg/Kg

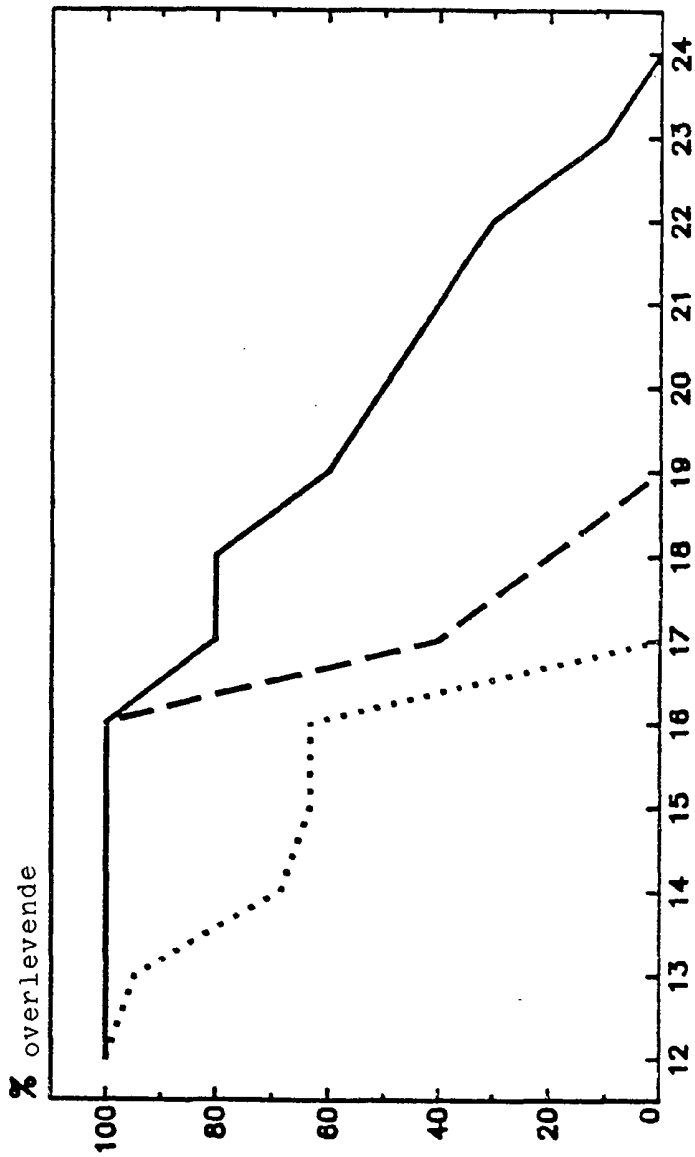
300954

Fig. 4.

DAUNOMYCIN KJEMOTERAPI: enkel dose
 Fritt eller vesikkel-innesluttet medikament **vs. P-1798 Lymphosarcoma**

Kgnkroll
 5% Dex

 Fritt Dau
 20mg/Kg
 - - - - -
 Dau/Ves
 20mg/Kg



Dager etter tumorimplantasjon

Behandling på dag 3

300954

Fig. 5.

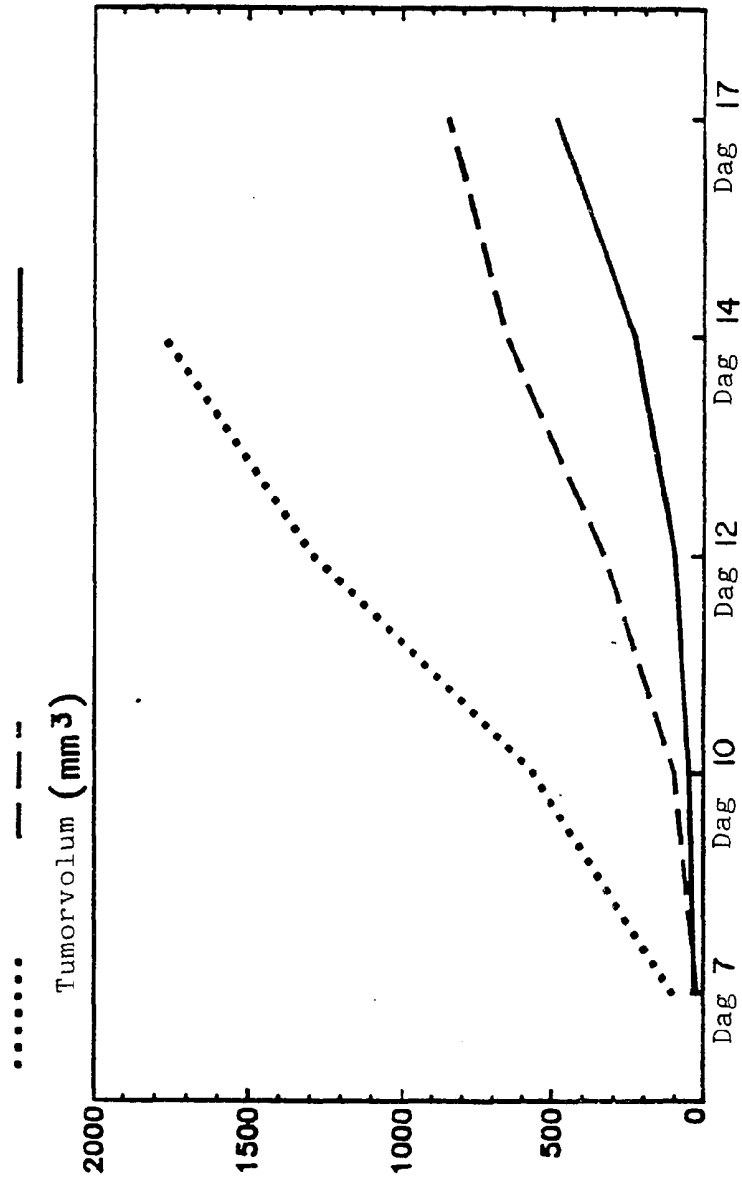
DAUNOMYCIN KJEMOTERAPI: enkel dose (20mg/Kg)

Behandling av fast P-1798 Lymphosarcoma

Dag Ves
Dag 3

Fritt Dgu
3

Kontroller



Dager etter tumorimplantasjon

Behandling på dag 3

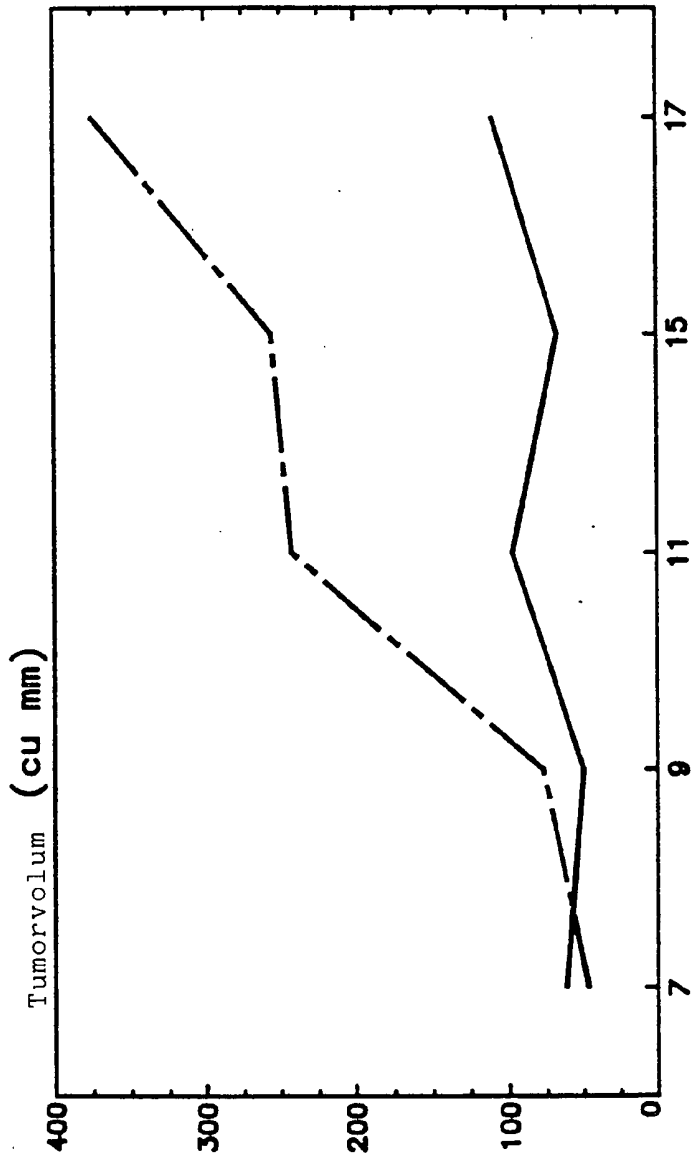
300954

Fig. 6.

DAUNOMYCIN KJEMOTERAPI: multipl dose
Behandling av **P-1798 Lymphosarcoma** i **CD2F1** Mus

Fritt Dau
20mg/Kg

Dau Ves
20mg/Kg

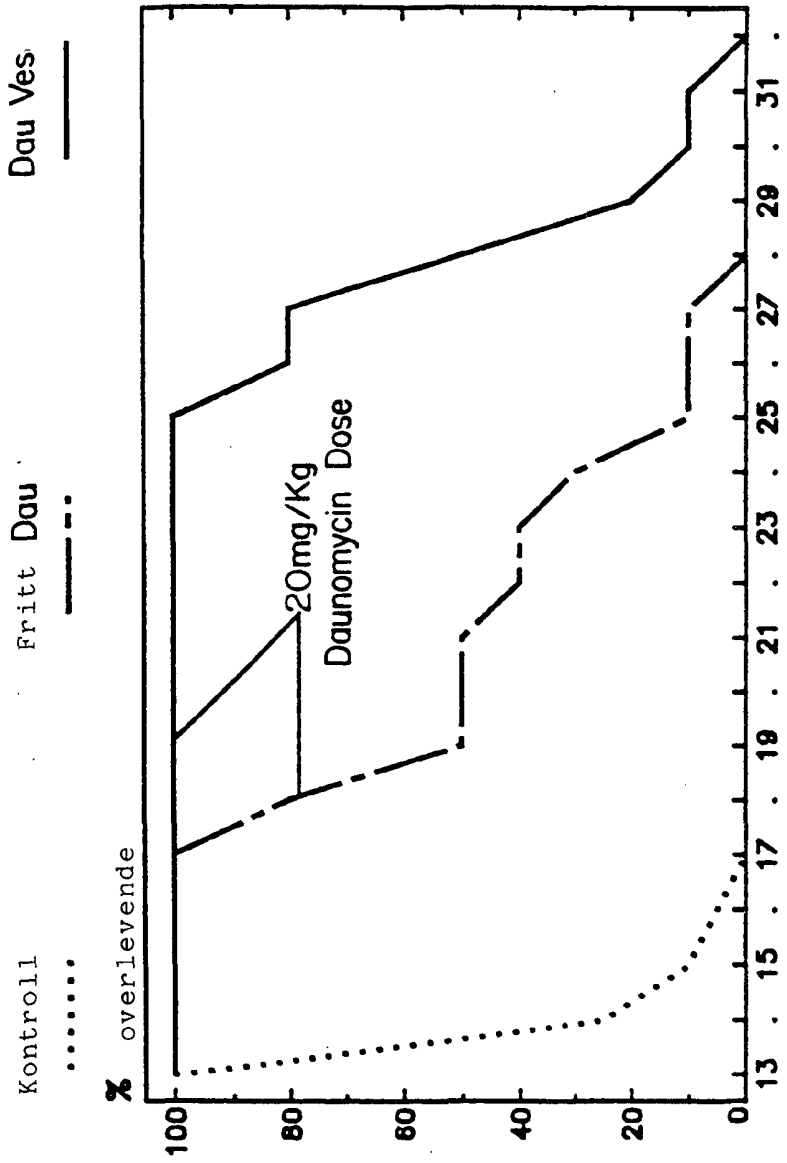


Dager etter tumorimplantasjon
I.V. terapi på dag 4, 11 og 18

300954

Fig. 7.

DAUNOMYCIN KJEMOTERAPI: multippel dose
 Behandling av **P-1798 Lymphosarcoma** i **CD2F1** mus

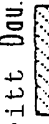
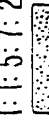
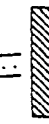
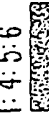


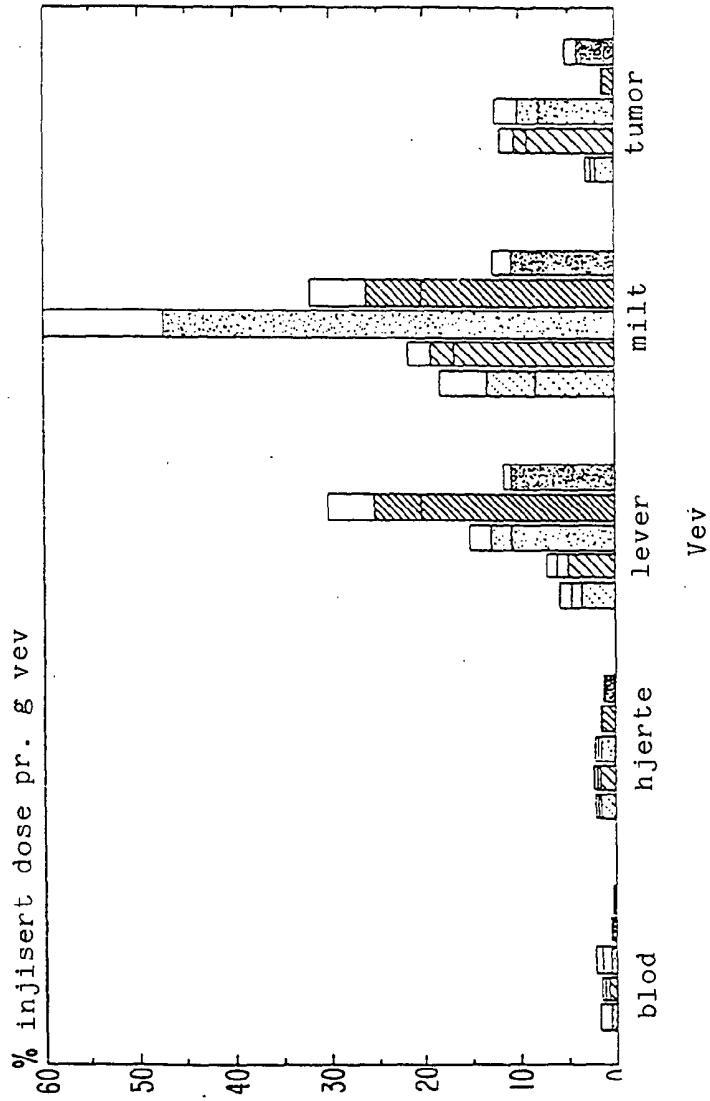
Dager etter tumorimplantasjon

Behandling på dag 4, 11 og 18

Fig. 8.

24 timers fordeling av (H-3)-Dau
i P-1798 TUMOR-bærende CD2F1 mus

Fritt Dau.	Dau. Ves. l: 5:7:0	Dau. DSPG l: 1	Dau. Ves. l: 4:5:6
			

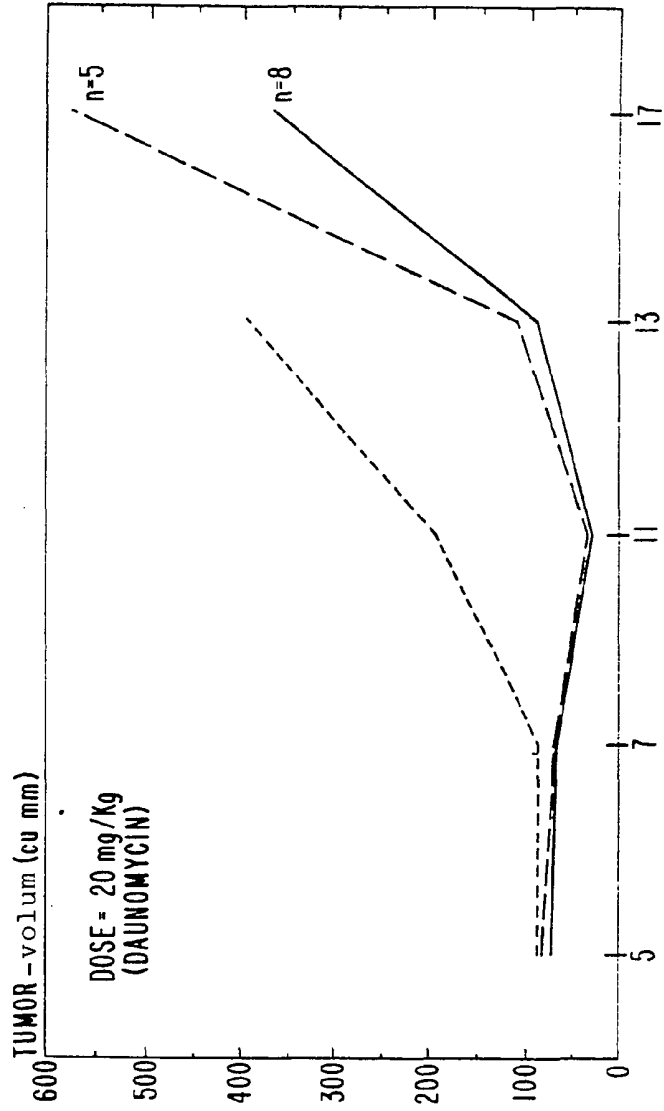


Dose = 20 mg/kg: (n = 5 pr. gruppe)

FIG. 9

DAUNOMYCIN KJEMOTERAPI: enkel dose
 Behandling av P-1798 LYMPHOSARCOMA i CD2F1 mus

Fritt - Dau ----- Dou - Ves ----- Dou - Ves -----
 | : 4 : 5 : 8 | : 4 : 5 : 8



Dager etter tumorimplantasjon

Gj.sn. på n = 10 mus pr. gruppe unntatt som angitt

FIG. 11

DAUNOMYCIN BIOFORDELING: fritt og innesluttet
CD2F1 mus med P-1798 LYMPHOSARCOMA
Fritt - Dau
20mg/Kg
Dau - Ves
20mg/Kg

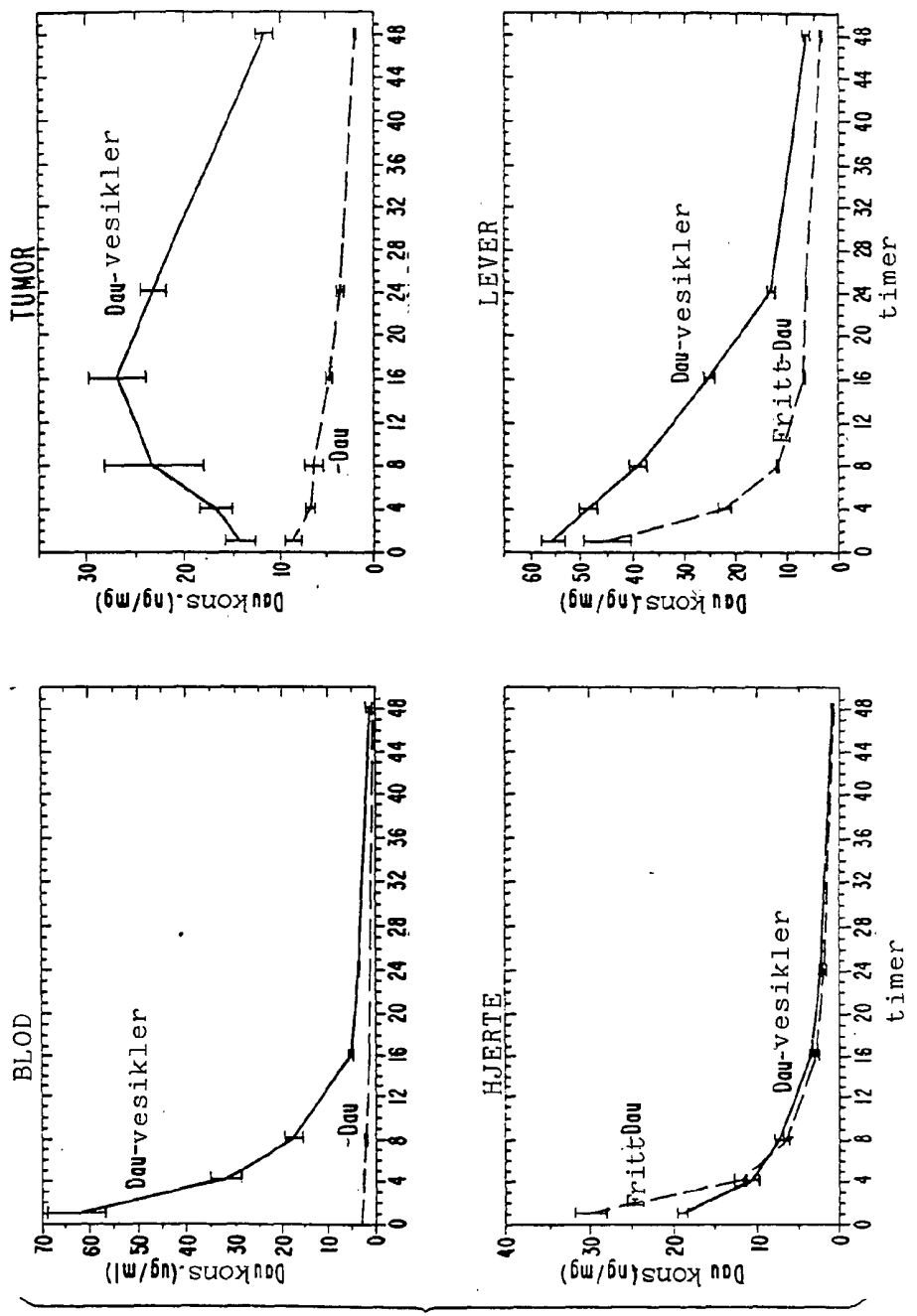


FIG. 12