

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 150967 B



(21) Patentansøgning nr.: 2913/76

(51) Int.Cl.⁴ B 01 J 13/02

(22) Indleveringsdag: 29 jun 1976

(41) Alm. tilgængelig: 31 dec 1976

(44) Fremlagt: 05 okt 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 30 jun 1975 FR 7520456

(71) Ansøger: *L'OREAL S.A.; 14; rue Royale 75; Paris 8eme, FR

(72) Opfinder: Guy *Vanlerberghe; FR, Rose-Marie *Handjani; FR

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Dispersion af småkugler og fremgangsmåde til dens fremstilling

(56) Fremdragne publikationer

DE off.g. skrift nr. 2249552

DK 150967 B

Det er velkendt, at visse lipoider er i stand til i nærværelse af vand at danne mesomorfe faser, hvis tilstandsform er midt imellem den krystallinske tilstand og den flydende tilstand. Blandt de lipoider, der er i stand til at danne mesomorfe faser, er det allerede vist, at visse kan kvælde i vandig opløsning, hvorved der dannes små kugler, der er dispergeret i det vandige miljø. Disse kugler består af multimolekylære lag og fortrinsvis af bimolekylære lag, der har en tykkelse på ca. 30 til 100 Å (se især artiklen af Bangham, Stedman og Watkins, J. Mol. Biol., 13,238 (1965)).

Indtil nu har det kun været muligt at opnå lipoidkugler, der har bestået af koncentriske lag, ved at anvende lipoider, der indeholder en hydrofil iongruppe og en lipofil gruppe, og de fremstillingsmåder, som man har beskrevet,

medførte at man opnåede kugler, der havde en middeldiameter, der var mindre end 1000 Å. Fremgangsmåden til fremstilling af disse kugler består i at frembringe en dispersion, hvor dispersionsfasen indeholder den lipoid forbindelse, der er i stand til at danne kuglerne, og at underkaste denne dispersion en ultralydbehandling. For at frembringe den dispersion, der skal underkastes ultralydbehandling, kan man først ved fordampning frembringe en tynd film af den lipoidforbindelse, der skal dispergeres, på en skærm, dernæst kan man bringe den således dækkede skærm i kontakt med den kontinuerte fase af den dispersion, der skal fremstilles og endelig for det tredje omrøre for at opnå den dispersion, der skal behandles med ultralyd.

I tysk offentliggørelsesskrift nr. 2249552 beskrives en fremgangsmåde til fremstilling af småkugler bestående af koncentriske blade eller lameller, hvilke småkugler betegnes liposomer. Til dette formål anvendes lipidforbindelser, der som hydrofile grupper har en phosphat-, carboxyl-, sulfat-, amino- eller cholingruppe, og som hydrofobgruppe en alkyl-, alkenyl- eller alkinylgruppe. Disse liposomer er ionogene forbindelser, og liposomernes diameter er begrænset til højst 1000 Å og er fortrinsvis mellem 200 og 500 Å. Som det overraskende er blevet påvist ved nedenstående nærmere beskrevne sammenligningsforsøg er dispersionen ifølge opfindelsen væsentligt overlegen i forhold til det i nævnte offentliggørelsesskrift beskrevne produkt med hensyn til evnen til at optage et aktivt stof, som skal indkapsles, samt med hensyn til stabiliteten og permeabilitetsforhold.

Man har allerede foreslået at anvende liposomer til at indeslutte vandige opløsninger indeholdende aktive forbindelser i de vandige rum, der findes mellem de dobbelte lipoidlag for på denne måde at beskytte de indkapslede forbindelser mod de ydre påvirkninger, (se især artiklen af Sessa og Weismann, J. Lipid Res., 9,310 (1968) og artiklen af Magee og Miller, Nature, Vol 235 (1972). Liposomerne kan være af varierende størrelse i området mindre end 1000 Å. Man kan variere deres indtrængningsevne i det menneskelige legeme, hvilket tillader utallige anvendelser inden for farmacien, ligesom deres elektriske ladning tillader en udvælgelse af deres fastgørelsessted (Biochem. J. (1971), 124p.58P). Anvendelsen af kugler med en diameter mindre end 1000 Å er inden for det kosmetiske område tilbøjelig til at frembyde visse ubehageligheder på grund af risikoen for at produktet trænger gennem huden. Det er således klart, at i det mindste til dette anvendelsesformål ville det være ønskeligt at kunne frembringe kugler med koncentriske lipoidlag med en diameter, der er større end 1000 Å.

Yderligere har de hidtil kendte fremgangsmåder til opnåelse af liposomer, der indeslutter aktive forbindelser mellem deres koncentriske lipoidlag, betyde-

lige ulemper: for det første er den aktive forbindelse, der befinder sig i den kontinuerede dispersionsfase, som man underkaster ultralydbehandling, kun indkapslet mellem liposomernes lipoidlag for en meget lille dels vedkommende, da en meget lille del af den kontinuerede dispersionsfase befinder sig indkapslet mellem disse lag. Dersom man ønsker at isolere indkapslingsliposomerne er det nødvendigt at lade dispersionen, som man har underkastet ultralydbehandling, passere gennem en separationskolonne af typen "Sephadex", i hvilket tilfælde liposomerne udvindes som en stærkt fortyndet dispersion. Dette resulterer på den ene side i, at det med den hidtil kendte teknik er bogstavelig talt umuligt at opnå en kraftig koncentration af liposomer, og at på den anden side den aktive forbindelse kun er indesluttet for en lille del og tabes ved elueringen i separationskolonnen uden at det er praktisk muligt at genvinde den på en enkel måde. Dette medfører en betydelig forøgelse af fabrikationsprisen for de aktive forbindelser, der er indkapslet i liposomerne. Det er derfor ønskeligt at råde over en fabrikationsmetode til fremstilling af kugler af koncentriske lag, der muliggør, at man kan få en dispersion med stor koncentration af kugler med et reduceret tab af det produkt, der er indkapslet mellem kuglernes lag.

Endelig har de fabrikationsmetoder for liposomer, der er beskrevet indtil nu, angivet, at man kun kunne anvende visse særlige kategorier af lipoider: indtil nu har man inden for teknikken nævnt anvendelsen af phosphorlipoider, lipoider, der bærer en hydrofil iongruppe og en lipofil gruppe, og fede umættede syrer.

Det er ved opfindelsen tilsigtet at tilvejebringe en dispersion af småkugler af den art, som er angivet i indledningen til krav 1, samt en fremgangsmåde til dens fremstilling som angivet i indledningen til krav 2, i hvilken dispersion der foreligger en forøget koncentration af småkugler, hvorved det er muligt at opnå at småkuglerne indkapsler de aktive stoffer som skal indesluttet, med stort udbytte ved indeslutningsprocessen, således at der kan indkapsles en forøget mængde aktivt stof, hvilken dispersion er stabil og udviser gunstige permeabilitetsforhold.

Det tilsigtede opnås ved de foranstaltninger som er anført i de kendetegnende dele af kravene henholdsvis 1 og 2.

I en foretrukken udførelsesform er vægtforholdet mellem den vandige fase, der skal indkapsles, og som er bragt i kontakt med lipoiderne, og lipoiderne, der udgør den lamellære fase, mellem ca. 0,1 og ca. 3. Den vandige fase, der skal indkapsles, kan være vand eller en vandig opløsning af den aktive forbindelse. Vægtforholdet mellem dispersionsfasen, som man tilsætter, og den lamellære fase, som man dispergerer, kan være mellem ca. 2 og ca. 100. Dispersionsfasen og den vandige fase, der skal indkapsles, er fortrinsvis isoosmotiske. Dispersionsfasen kan fordelagtig være en vandig opløsning.

Omrøringen, der er det sidste trin af fremgangsmåden, opnås ved rystning i et rysteapparat. Fremgangsmåden udføres ved stuetemperatur eller ved en højere temperatur, dersom lipoiderne er faste ved stuetemperatur. Dersom man ønsker, at de opnåede kugler skal have en middeldiameter, der er mindre end 1000 Å, kan man underkaste kugledispersionen en ultralydbehandling.

For at danne den lamellære fase kan man anvende et enkelt lipoid eller en blanding af lipoider. Lipoidet/erne, som man anvender, bærer en lang lipofil kæde, der indeholder 12 til 30 carbonatomer, hvilken kæde er mættet eller umættet forgrenet eller lineær. Man kan specielt vælge olein-, lanolin-, tetradecyl-, hexadecyl-, isostearyl-, lauryl- eller alcoylphenylkæder. Medens lipoidets hydrofile gruppe, der danner den lamellære fase, er en ikke-ionisk gruppe, kan man fordelagtigt som hydrofil gruppe vælge en polyoxyethylen, en polyglycerol, en eventuelt oxyethyleneteret polyolæster og f.eks. en polyoxyethyleneteret sorbitolæster.

Man kan anvende en vandig fase til indkapsling indeholdende aktive forbindelser af alle arter og især sådanne forbindelser, der er af farmaceutisk eller levnedsmiddelmæssig interesse eller forbindelser, der har kosmetisk virkning. De aktive forbindelser kan f.eks. være, når det drejer sig om kosmetik: forbindelser, der er egnet til hudens eller hårets pleje f.eks. fugtighedsbevarere som glycerin, sorbitol, pentaerythritol, inositol, pyrrolidincarboxylsyren og dens salte; midler til kunstig bruning som f.eks. dihydroxyacetone, erythrulose, glyceraldehyd, α -dialdehyder såsom tartaraldehyd (forbindelserne kan eventuelt være associeret med farvestoffer): vandopløselige solbeskyttende forbindelser, antiperspirationsmidler, deodoranter, astringenter, svalende forbindelser, tonika, ardannende midler, keratolyserende midler, afhåringsmidler, parfumerede vand, ekstrakter af animalske eller vegetabiliske celler såsom proteiner, polysaccharider, amnionvæsker, vandopløselige farvestoffer, skælhæmmende midler, antiseboriske midler, oxideringsmidler (affarvningsmidler) såsom hydrogenperoxid, reduktionsmidler som f.eks. thioglycolsyren og dens salte. Som aktive farmaceutiske forbindelser kan nævnes: vitaminer, hormoner, enzymer (f.eks. peroxidase) vacciner, anti-inflammatoriske midler (f.eks. hydrocortison), antibiotika, baktericider.

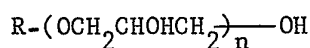
Det er klart, at man vil vælge, afhængig af den aktive substans indeholdt i den vandige fase, der skal indkapsles, de lipoider, der er i stand til på stabil måde at indkapsle den vandige fase, det drejer sig om. For at de lipoider, der udgør den lamellære fase, giver stabile kugler, er det nødvendigt, at der findes en tilstrækkelig gensidig lateral påvirkning mellem lipoidets kæder som, anbragt side om side, udgør lagene eller bladene af kuglerne, dvs. at de Van der Waalske kræfter mellem kæderne sikrer en tilstrækkelig cohesion af bladene. Denne betingelse er tilfredsstillet for de lipoider, der har de karakte-

ristika, der er angivet i den generelle beskrivelse for fremgangsmåden, der er angivet nedenfor. Lipoiderne kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, dersom de hører til den kategori af emulsionsdannere af typen vand i olie.

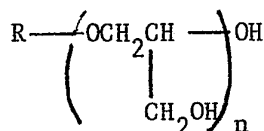
Fremgangsmåden ifølge opfindelsen tilvejebringer dispersioner af kugler, der består af amfifile ikke-ioniske lipoidforbindelser, og som af den grund danner hidtil ukendte forbindelser, der tillader en indkapsling af aktive forbindelser, der kan anvendes f.eks. i farmacien, inden for levnedsmiddelområdet eller inden for kosmetikken. Anvendelsen af ikke-ioniske forbindelser til dannelse af indkapslingskuglerne frembyder en ikke ringe interesse, når man ønsker at undgå, at kuglerne har en ydre overflade, der er elektrisk ladet.

De ikke-ioniske lipoidforbindelser er fortrinsvis valgt blandt gruppen bestående af:

lineære eller forgrenede polyglycerolethere med formlerne



eller



hvor n betegner et helt tal mellem 1 og 6, R betegner en lineær eller forgrenet alifatisk kæde, der er mættet eller umættet, med 12 til 30 carbonatomer, carbonhydridgrupperne af lanolinalkoholer, eller hydroxy-2-alkylgrupper af α -dioler med lang kæde;

polyoxyethylenerede fede alkoholer;

eventuelt oxyethylenerede polyolestre specielt polyoxyethylenerede sorbitolestre; glycolipoider af naturlig eller syntetisk oprindelse f.eks. cerebrosider.

Dispersionens kontinuerede fase, der omgiver kuglerne, er en vandig fase. Den vandige fase, der er indkapslet i kuglerne, er en vandig opløsning af en virksom forbindelse, fortrinsvis isoosmotisk med dispersionens kontinuerede fase.

Forskellige additiver kan være knyttet til de ikke-ioniske lipoidforbindelser for at modificere permeabiliteten eller overfladeladningen af kuglerne. Til dette formål kan nævnes eventuel tilsætning af langkædede alkoholer og dioler, steroler f.eks. cholesterol, langkædede aminer og deres kvaternære ammoniumderivater, dihydroxyalkylaminer, polyoxyethylenerede fede aminer, estere af aminoalkoholer med lang kæde, af deres salte og kvaternære ammoniumderivater phosphorestere af fede alkoholer f.eks. natriumdicytylphosphat, alkylsulfater f.eks. natriumcetylsulfat, visse polymere såsom polypeptider og proteiner.

Anvendelsen af de omhandlede vandige dispersioner inden for kosmetikken, frembyder store fordele sammenlignet med den hidtil kendte anvendelse af emulsioner. Det er i virkeligheden sådan, at dersom man ønsker at anvende præparater, der på én gang indeholder fede materialer og vand, er det nødvendigt for at sikre emulsionens stabilitet at anvende amphifile emulgeringsmidler. Det er velkendt, at visse emulgeringsmidler kan fremkalde nogen irritation, dersom de påføres huden. Man har under arbejdet med de omhandlede forbindelser fundet, at denne virkning af emulgeringsmidler, for en given kemisk opbygning, i høj grad afhænger af, hvordan de anvendes. Man har således kunnet vise, at en emulsion olie/vand bestående af 42% perhydrosqualen, 8% emulgeringsmiddel og 50% vand er særdeles irritationsfremkaldende, medens en vandig dispersion af 8% af det samme emulgeringsmiddel udviser en irritationspåvirkning, der er praktisk taget ubetydelig, og at perhydrosqualenet er fuldstændigt uskadeligt. Det fremgår heraf, at der er en irritationssynergi, når man har et emulgeringsmiddel og en oliefase til stede. De omhandlede vandige dispersioner muliggør at undgå samtidig anvendelse af et emulgeringsmiddel og en olie, hvilket er et afgørende fremskridt inden for kosmetikken.

Det bør bemærkes, at man til de omhandlede dispersioner af kugler kan tilsætte forskellige hjælpestoffer for at forandre udseendet eller den organoleptiske karakter, såsom uklarhedsdannende midler, geleringsmidler, aromastoffer, parfumer eller farvestoffer.

Det bemærkelsesværdige ved de omhandlede dispersioner er, at de muliggør indførslen af hydrofile forbindelser i et fuldstændigt lipofilt miljø. Dette bevirker under disse forhold, at disse befinder sig maskerede eller beskyttede over for forskellige midler, der kan påføre mulige ændringer: oxideringsmidler, fordøjelsessafter og mere generelt reaktive forbindelser over for de indkapslede forbindelser. Penetrationen og/eller fixeringen af de aktive forbindelser kan ændres ved at forandre kuglernes størrelse og deres elektriske ladning. Deres virkning kan ligeledes være forskellig (protraheret virkning). Det, at de er maskerede, gør, at man i vid udstrækning kan undertrykke eller forandre deres organoleptiske karakter, især deres smag. Endelig besidder lipoiderne i disse præparater i sig selv en gavnlig virkning f.eks. blødgørende, smørende, glatterende.

Opfindelsen beskrives nærmere i de efterfølgende eksempler,

Eksempel 1

I en rundbundet kolbe på 50 ml sammenbringes 500 mg sorbitoltrioleat, der er oxyethylenet med 20 mol oxyethylen (forbindelse "Tween 85" solgt af selskabet ICI Atlas) og 0,335 ml af en 0,7 molær opløsning af sorbitol, og man homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

Man tilsætter herefter 3 ml af en vandig opløsning på 1% af en forbindelse, der kendes under sit handelsnavn "Carbopol 934" (polyacrylsyre netdannet med polyallylsucrose, solgt af selskabet "Goodrich"). Kolben, der er anbragt i et rysteapparat, omrystes energisk i 1 time.

Den opnåede dispersion er geleret. Kuglernes diameter er større end 1 mikron.

Eksempel 2

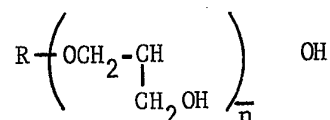
I en rundbundet kolbe på 50 ml blander man grundigt 250 mg oleylalkohol, der er oxyethylenet med 10 mol (forbindelse "Brij 96" forhandlet af selskabet ICI Atlas), og 250 mg oleylalkohol, der er oxyethylenet med 2 mol (forbindelse "Brij 92" forhandlet af selskabet ICI Atlas). Herefter bringer man den opnåede blanding i kontakt med 1 ml af en 0,5 molær opløsning af glycerol, og blandingen homogeniseres. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

Herefter tilsætter man 20 ml af en 0,245 molær opløsning (NaCl, KCl). Kolben anbringes på et rysteapparat, hvorefter man omryster energisk i 1 time.

Den opnåede dispersion er flydende og mælkeagtig. Kuglernes diameter er ca. 1 mikron.

Eksempel 3

I en rundbundet kolbe på 50 ml sammenbringes 500 mg af en forbindelse med den almene formel:



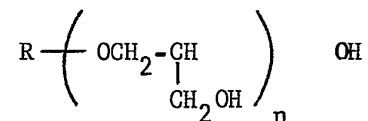
hvor R betegner alkoylgruppen af hydrogenerede lanolinalkoholer, og $\bar{n}$ har en statistisk værdi, der er mindre end 3, og 220 ml af en 0,5 molær opløsning af pentaerythritol. Herefter homogeniserer man blandingen. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

Herefter tilsætter man 4 ml vand. Kolben anbringes på et rysteapparat, og man omryster energisk i 30 minutter.

Den opnåede dispersion har et mælkeagtigt udseende. Kuglernes diameter er større end 1 mikron.

Eksempel 4

I en rundbundet kolbe på 50 ml sammenbringes 500 mg af en forbindelse med den almene formel



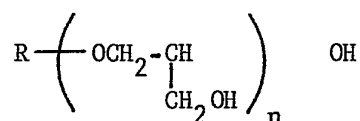
hvor R betegner gruppen tetradecyl, og n er lig med 2, med 0,75 ml af en 0,4 molær opløsning af sorbitol. Herefter homogeniserer man blandingen. Forsøget udføres ved 40°C.

Herefter tilsætter man 4 ml vand. Kolben anbringes på et rysteapparat, og man omryster energisk i 30 minutter.

Den opnåede dispersion er klar efter gennemledning af ultralyd. Kuglernes diameter er mindre end 1 mikron.

Eksempel 5

I en rundbundet kolbe på 50 ml sammenbringes 500 mg af en forbindelse med den almene formel



hvor R betegner gruppen hexadecyl, og n er lig med 2, og 0,335 ml af en 0,3 molær opløsning af cysteinchlorhydrat. Herefter homogeniserer man blandingen. Forsøget udføres ved 55°C.

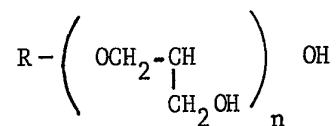
Herefter tilsætter man 4,1 ml af en 0,145 molær opløsning (NaCl, KCl). Kolben anbringes på et rysteapparat, og man omryster kraftigt i 3 timer.

Den opnåede dispersion er næsten gennemsigtig ved 55°C. Kuglernes diameter er ca. 2 mikron. Ved langsom afkøling af dispersionen til stuetemperatur, opnår man en hvid uklar gel.

Dispersionen, der holdes ved 55°C, kan eventuelt fortyndes med en isoosmotisk opløsning, der indeholder et fortykkelsesmiddel såsom gummier eller polymere. Herved opnår man en let uklar opløsning. Fortyndingsforholdet vælges alt efter, hvilken opløsning man ønsker at opnå.

Eksempel 6

I en rundbundet kolbe på 50 ml, der er anbragt i et vandbad på 55°C bringer man 500 mg af en forbindelse med den almene formel



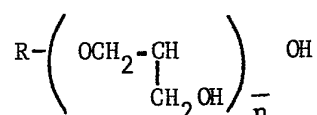
hvor R betegner en hexadecylgruppe, og n er lig 2, i kontakt med 10 ml af en 0,3 molær opløsning af methionin. Man homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved 55°C.

Kolben anbringes på et rysteapparat, og man omryster energisk i 3 timer ved 55°C.

Den opnåede dispersion er gennemsigtig. Kuglernes diameter er ca. 1 mikron. Ved afkøling til stuetemperatur får man en hvid gel.

Eksempel 7

I en rundbundet kolbe på 50 ml bringer man 500 mg af en forbindelse med den almene formel



hvor R betegner alkylgruppen af isostearylalkohol, $\bar{n}$ har en statistisk værdi, der er mindre end 2, i kontakt med 5 ml vand. Man homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

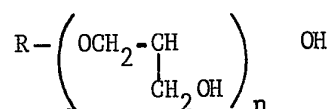
Man anbringer kolben på et rysteapparat og omryster kraftigt i 4 timer.

Den opnåede dispersion er mælkeagtig. Kuglernes diameter er ca. 5 mikron.

Dispersionen kan underkastes ultralydbehandling, hvorved man reducerer kuglernes størrelse betydeligt.

Eksempel 8

I en rundbundet kolbe på 50 ml opløser man 83,2 mg (200 μ -mol) af en forbindelse med den almene formel



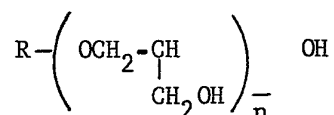
hvor R betegner alkylgruppen af oleylalkohol, og n er lig med 2, i 2 ml af en blanding af chloroform-methanol i forholdet 2:1. Man afdamper opløsningsmidlet ved hjælp af en roterende fordamper, og man fjernes de sidste spor af opløsningsmiddel ved hjælp af en vingepumpe i 1 time.

Man bringer 10 ml af en 0,3 molær opløsning af glucose i kontakt med lipoidet. Kolben, der er anbragt på et rysteapparat, rystes kraftigt i 4 timer. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

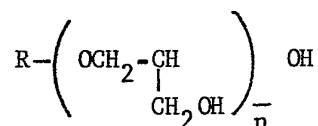
Dispersionen underkastes ultralydbehandling i 20 minutter. Herefter er kuglernes diameter reduceret til en værdi, der er mindre end 0,5 mikron. Man filtrerer herefter dispersionen på en gelkolonne "Sephadex G 50 grov", der er kvældet i en opløsning af 0,145 molær (NaCl, KCl). Den opnåede opløsning er let blålig.

Eksempel 9

I en rundbundet kolbe på 50 ml blander man grundigt 58 mg af en forbindelse med den almene formel



hvor R betegner alkylgruppen af isostearylalkohol, $\bar{n}$ er lig med 2, med 58 mg af en forbindelse med den almene formel



hvor R betegner alkoylgruppen af "isostearyl"-alkohol, $\bar{n}$ er lig med 6, og herefter bringer man den opnåede blanding i kontakt med 10 ml af en 1 molær opløsning af glucose. Forsøget udføres ved stuetemperatur. Kolben anbringes på et rysteapparat, og man omryster kraftigt i 4 timer.

Den opnåede dispersion er meget findelt. Kuglerne har en diameter på ca. 1 mikron. Man kan underkaste dispersionen ultralydbehandling i 30 minutter, hvorved kuglernes størrelse sænkes til en værdi, der er mindre end 0,5 mikron.

Den opnåede dispersion, dels med kugler med en diameter, der er større end 1 mikron, dels med kugler, der har en diameter, der er mindre end 1 mikron, filtreres på en gelkolonne "Sephadex G 50 grov", der er kvældet i en opløsning af 0,475 molær (NaCl, KCl).

Eksempel 10

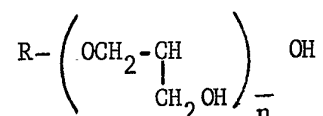
I en rundbundet kolbe på 50 ml bringer man 500 mg af monolauryletheren af tetraethylenglycol i kontakt med 0,4 ml af en 0,3 molær opløsning af glucose. Man homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

Herefter tilsætter man 5 ml af en opløsning af 0,145 molær (NaCl, KCl). Kolben anbringes i et rysteapparat, og man omryster kraftigt i 15 minutter.

Den opnåede dispersion er gennemsigtig. Kuglernes diameter er ca. 1 mikron.

Eksempel 11

I en rundbundet kolbe på 50 ml bringer man 500 mg af en forbindelse med den almene formel



hvor R er en hexadecylgruppe, og $\bar{n}$ har en statistisk værdi, der er mindre end 3, i kontakt med 0,5 ml af en opløsning af 50 mg/ml af "Crotéine C" (protein med en molvægt på ca. 10000, solgt af selskabet "CRODA").

Man homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved 60°C.

Herefter tilsætter man 4 ml af en opløsning på 0,145 molær (NaCl, KCl).

Kolben anbringes i et rysteapparat, og man omryster kraftigt i 3 timer.

Den opnåede dispersion er gennemsigtig. Kuglernes diameter er ca. 1 mikron. Ved langsom afkøling til stuetemperatur får man en hvid uigennemsigtig gel.

Eksempel 12

I en rundbundet kolbe på 50 ml bringer man 300 mg sphingomyelin i kontakt med 0,350 ml af en 0,3 molær opløsning af glucose. Man homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

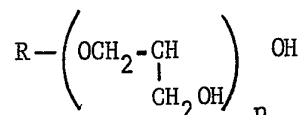
Herefter tilføjer man 5 ml af en opløsning på 0,145 molær (NaCl, KCl). Man anbringer kolben i et rysteapparat og omryster kraftigt i 2 timer.

Den opnåede dispersion er mælkeagtig. Kuglernes diameter er ca. 2 mikron.

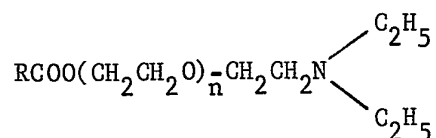
Dispersionen kan underkastes ultralydbehandling i 2 timer, hvorved kuglernes diameter formindskes.

Eksempel 13

I en rundbundet kolbe på 50 ml blander man grundigt 300 mg af en forbindelse opnået ved moldestillation med den almene formel



hvor R betegner alkylgruppen af oleylalkohol, og n er lig med 2; 150 mg cholesterol; 50 mg af en amin med den almene formel



hvor RCOO betegner kokusoliegruppen, og n er et tal mellem 2 og 5, og man bringer den opnåede blanding i kontakt med 0,5 ml af en 0,3 molær opløsning af sorbitol. Man homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

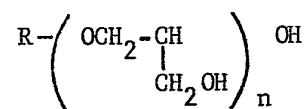
Herefter tilsætter man 4 ml af en opløsning af 0,145 molær (NaCl, KCl).

Kolben anbringes på et rysteapparat, og man omryster kraftigt i 4 timer.

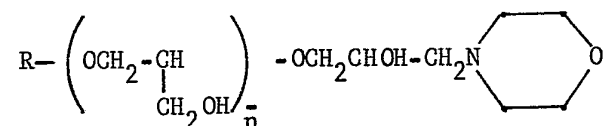
Den opnåede dispersion er opaliserende diameteren af kuglerne er ca. 2 mikron.

Eksempel 14

I en rundbundet kolbe på 50 ml bringer man 425 mg af en forbindelse med den almene formel



hvor R betegner alkylradikalet af oleylalkohol, og n er et tal lig med 2, og 75 mg af en amin med den almene formel



hvor R betegner oleylgruppen, og $\bar{n}$ betegner en statistisk værdi mindre end 1, i kontakt med 0,5 ml af en 0,3 molær opløsning af glucose. Man homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

Herefter tilsætter man 4 ml af en 0,145 molær opløsning (NaCl, KCl).

Kolben anbringes i et rysteapparat, og man omryster energisk i 4 timer.

Den opnåede dispersion er uigennemsigtig. Kuglernes diameter er større end 2 mikron.

Dispersionen kan underkastes ultralydbehandling. Herved bliver kuglernes størrelse mindre i mikron.

Eksempel 15

I en rundbundet kolbe på 50 ml bringes 300 mg sphingomyelin i kontakt med 0,350 ml af en 0,3 molær opløsning af ascorbinsyre. Man homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved stuetemperatur.

Herefter tilsætter man 2,650 ml af en opløsning på 0,145 molær (NaCl, KCl). Kolben anbringes i rysteapparatet, og man omryster energisk i 4 timer.

Den opnåede dispersion er mælkeagtig. Kuglernes diameter er ca. 2 mikron.

Dersom det ønskes, kan dispersionen filtreres på en gelkolonne "Sephadex G 50 grov", der er kvældet i en opløsning af 0,145 molær (NaCl, KCl).

Eksempel 16

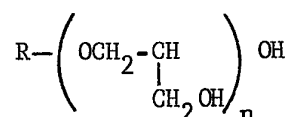
I en rundbundet kolbe på 50 ml opløses 142 mg af natriumsaltet af N^2 -(alkoylolein)-N-dodecyl-N(N',N'-diethylaminoethyl)-asparagin i 2 ml af en blanding af chloroform-methanol i forholdet 2:1. Man afdamper opløsningsmidlet ved hjælp af en roterende afdamper. Herefter fjerner de sidste spor af opløsningsmiddel ved at underkaste produktet i 1 time for reduceret tryk, der frembringes med en vingepumpe.

Man bringer 10 ml af en opløsning af 0,3 molær glucose i kontakt med lipoidet.

Kolben anbringes på et rysteapparat, og man ryster kraftigt i 4 timer. Forsøget udføres ved stuetemperatur. Kuglernes størrelse er ca. 1 mikron. Dispersionen filtreres herefter på en gelkolonne "Sephadex G 50 grov", der er kvældet i en opløsning af 0,145 molær (NaCl, KCl).

Eksempel 17

I en kolbe på 50 ml opløser man 80 mg af en forbindelse med den almene formel



hvor R betegner en hexadecylgruppe, og n er lig med 2, 10 mg cholesterol og 10 mg dicetylphosphat i 2 ml af en blanding af chloroform/methanol i forholdet 2/1.

Man afdamper opløsningsmidlet ved hjælp af en roterende afdamper, og derefter fjerner man de sidste spor af opløsningsmiddel ved hjælp af en vingepumpe i 1 time.

Herefter bringer man 10 ml af en 0,15 molær opløsning af natriumsaltet af pyroglutaminsyre i kontakt med lipoiderne. Kolben anbringes i et rysteapparat,

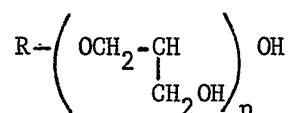
og man omryster kraftigt i 2 timer på et vandbad ved 55°C. Herefter afkøler man langsomt, til man når til stuetemperatur.

Dispersionen underkastes ultralydbehandling i en time ved en temperatur tæt på stuetemperatur. Herefter filtrerer man dispersionen på en gelkolonne "Sephadex G 50 grov", der er kvældet i destilleret vand.

Den opnåede dispersion er flydende og klar efter behandling med ultralyd. Kuglernes diameter er mindre end 1 mikron.

Eksempel 18

I en rundbundet kolbe på 50 ml blander man grundigt 240 mg af en forbindelse med den almene formel



hvor R betegner en alkoylgruppe af hydrogenerede lanolinalkoholer, og n har en statistisk værdi mindre end 3, og 60 mg cholesterol.

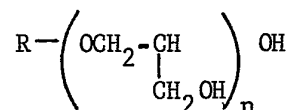
Man bringer den opnåede blanding i kontakt med 0,4 ml af en 0,15 molær opløsning af natriumsaltet af pyroglutaminsyre, og herefter homogeniserer man blandingen. Forsøget udføres ved 45°C. Herefter tilsætter man 4,6 ml af en 9 ‰ opløsning af natriumchlorid.

Kolben, der er anbragt på et vandbad, omrystes energisk ved hjælp af et rysteapparat i 2 timer ved 45°C, herefter afkøler man gradvis indtil stuetemperatur.

Den opnåede dispersion er flydende og mælkeagtig. Kuglernes diameter er større end 1 mikron.

Eksempel 19

I en rundbundet kolbe på 50 ml blander man grundigt 200 mg af en forbindelse med den almene formel:



hvor R betegner en hexadecylgruppe, og n er lig med 2, 25 mg cholesterol og 25 mg dicetylphosphat. Man bringer den opnåede blanding i kontakt med 0,3 ml af en 10% opløsning af tartaraldehyd og homogeniserer blandingen. Forsøget udføres ved 55°C. Herefter tilsætter man 4,7 ml af en opløsning af 0,145 molær (NaCl, KCl).

Kolben anbringes på vandbad og omrøres kraftigt ved hjælp af et rysteapparat i 2 timer ved 55°C. Herefter afkøler man gradvis til stuetemperatur.

Den opnåede blanding er geleret og har et let blåligt udseende.

Samtidig påførsel på huden af denne dispersion af niosomer og en vandig opløsning med samme slutkoncentration af tartaraldehyd bevirker, at man opnår to virkninger af niosomerne, idet de tydeligt forstærker den udviklede farve og klart forbedrer holdbarheden af farven ved vask med vand eller med detergenter.

De ovenfor nævnte udførelseseksempler skal på ingen måde betragtes som begrænsende for opfindelsen. Man kan foretage alle ønskelige modifikationer, uden at gå uden for den foreliggende opfindelses rammer.

S A M M E N L I G N I N G S F O R S Ø G

A. Sammenligningsforsøg med permeabilitet af ioniske og ikke-ioniske liposom-dispersioner.

Ved den klassiske omrøringsmetode kan man med phospholipider såvel som med ikke-ioniske lipider opnå dispersioner af blærer med flere lag, som har en gennemsnitlig diameter større end eller lig med 1 mikron.

Ved anvendelse af ultralyd kan man kraftigt formindske størrelsen af blærerne og opnå sådanne med en diameter på ca. 500 Å.

Størrelsen af med ultralyd behandlede blærer (250-1000 Å) kan måles ved iagttagelse under elektronmikroskop, idet man anvender en passende fremkalder, f.eks. natriumsaltet af phosphorwolframsyre.

Permeabiliteten af blærerne før og efter ultralydsbehandlingen blev målt ved enzymatisk mikrobestemmelse af glukose.

Dispersionen blev fremstillet som følger:

Lipiderne forenes, idet de sættes til en chloroform-methanol-opløsningsmiddelblanding 2:1.

Man fremstiller en 3%'s dispersion af lipidblandingen i en 0,3 m-glukoseopløsning.

Temperaturen af dispersionen indstilles til en temperatur over krystallisationspunktet for hovedlipidet, hvorpå dispersionen afkøles til stuetemperatur under omrøring.

Man behandler i 30 minutter med ultralyd ved direkte kontakt med mikrosonden, idet dispersionen holdes under nitrogenatmosfære, hvis den indeholder oxyderbare liposomer. Temperaturen holdes over krystallisationstemperaturen for hovedlipidet.

Derpå filtreres over en søjle med gel af modificeret dextran, med partikelstørrelsen "grov" (anvendt i en 9%'s kogesaltsopløsning).

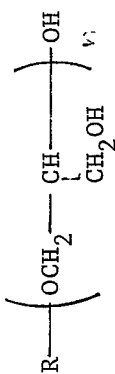
Forsøgsresultaterne med hensyn til optagelsesevnen for liposomerne overfor aktive opløsninger (her glukose) og permeabiliteten af liposomerne er sammenfattet i følgende tabeller 1 til 3:

T A B E L I
Ioniske liposomer

Dispersionens art
ikke-ionisk liposom

Lipidsammensætning i %

Produkt med den almene formel



R betyder en hexadecylgruppe

n er 2	45	47,5	Æggelecithin	85	Æggelecithin	75	Æggelecithin	54
Cholesterol	50	47,5	Cholesterol	10	Cholesterol	20	Cholesterol	40
Natrium-dicetylphosphat	5	5	Natriumdice- tylphosphat	5	Natriumdice- tylphosphat	5	Natriumdice- tylphosphat	6
Opkvældning % *)	93	90		87		34		92
% tab af glukose								
1 time **)	0,02	0,24				0,40		0,08
18 timer	0,02	0,24		0,52		0,80		0,13
1 dag		0,35				1,00		0,24
5 dage	0,05	0,35				1,00		0,48
7 dage				1,00		1,00		

Gennemsnitlig størrelse >1000Å ≤1000Å >1000Å

*) Kvældning af liposomerne:

Omfanget af blærenes kvældning er udtrykt som forholdet mellem vægten af den indkapslede opløsning og blærenes totalvægt. Til dette formål må mængden af indkapslet glukose fastslås. Det bestemmes som forskellen mellem to-
talglukosemængden og den frie glukose målt i dispersionen 1 time efter afslutning af filtreringen.

**) Liposompermeabilitet:

Blærenes permeabilitet for det indkapslede opløste stof bestemmes mængdemæssigt ud fra det procentuelle tab af optaget glukose. Mængden af optaget glukose fås ud fra forholdet mellem fri glukose ved målingens begyndelse og mængden af totalglukose, en eller flere dage efter afslutningen af filtreringen.

Ultralydsbehandling af den ioniske liposom-dispersion:

Sammensætning:

Æggelecithin	85%
Cholesterol	10%
Natriumdicetylphosphat	5%

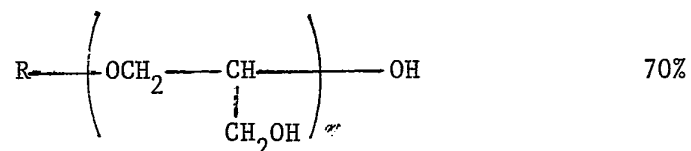
T A B E L 2

Varighed af ultralyds- behandlingen, minutter	Opkvældning	% tab efter 1 døgn
0	76	0,6
5	44	0,5
20	33	1,0
60	21	1,0

Ultralydsbehandling af ikke-ioniske liposom-dispersioner
(Niosomer):

Sammensætning:

Produkt med den almene formel



hvor R = alkyl fra hydrerede lanolinalkoholer og
 n svarer til statistisk middelværdi på 3

Cholesterol	20%
Natrium-dicetylphosphat	10%

T A B E L 3

Varighed af ultralyds- behandlingen, minutter	Opkvældning	% tab efter 1 døgn
0	80	0,0
20	53	0,1

Analyse af forsøgsresultater:

Forsøgsresultaterne i Tabel 1 viser, at ved liposomerne (diameter $>1000\text{\AA}$ og $\leq 1000\text{\AA}$) er en formindskelse af blærenes størrelse i alle tilfælde forbundet med en forøgelse af en øget gennemtrængelighed for det opløste stof. Permeabiliteten af de ikke-ioniske liposomer tiltager dog mindre stærkt med diameterens formindskelse ved de ikke-ioniske liposomer, end ved de ioniske liposomer.

Forsøgsresultaterne i Tabel 1 viser endvidere, at de ikke-ioniske liposomer med størrelser $\leq 1000\text{\AA}$ er overlegne i forhold til de kendte liposomer af tilsvarende størrelse, også med hensyn til mængden af optaget glukoseopløsning. De optager, om det kan ses af opkvædningsdata, ca. den tredobbelte mængde opløst stof.

Forsøgsresultaterne i Tabel 2 og 3 viser, at tabet af indesluttet glukose hos de ikke-ioniske liposomer (se Tabel 2), dvs. permeabiliteten af disse liposomer, forøges med varigheden af ultralydsbehandlingen. Permeabiliteten synes her at være sammenknyttet med størrelsen af blærerne, således at blærer med mindre diametre er mere gennemtrængelige end blærer med store diametre.

I modsætning hertil udviser de ikke-ioniske liposomer (se Tabel 4) også ved en ultralydsbehandling i 20 minutter og en dermed forbundet formindskelse af diameteren kun en særdeles ringe forøgelse af permeabiliteten.

B. Sammenligningsforsøg vedrørende stabiliteten af de ioniske og ikke-ioniske liposom-dispersioner.

I. Ioniske liposom-dispersioner.

Formuleringen omfatter 75% æggelecithin, 20% kolesterol og 5% dicetylphosphat.

Fremstilling af den ioniske liposom-dispersion.

I en 50 ml rundbundet kolbe opløses 375 mg æggelecithin, 100 mg kolesterol og 25 mg natriumdicetylphosphat i 3 ml af en blanding af chloroform og methanol (2:1).

Opløsningsmidlet fjernes ved hjælp af en rotationsfordamper, og de sidste spor af opløsningsmiddel fjernes ved at blandingen holdes en time under reduceret tryk.

Den opnåede lipidfilm tilsættes ved 40°C 8 ml af en vandig 9% natriumchloridopløsning. Kolbeindholdet røres to timer ved 40°C og afkøles derpå langsomt til omgivelsernes temperatur. Kolben befinder sig under omrøringen på et rysteapparat.

Man underkaster derpå dispersionen ultralydsbehandling i en time ved direkte kontakt med en lydsonde. Den under nitrogen stående dispersion holdes ved hjælp af et vandbad ved en ydertemperatur på 50°C .

Efter ultralydsbehandlingen filtreres dispersionen over en søjle med agarosegel i perleform, opkvædet i en 9‰-natriumchloridopløsning (egnet størrelse for søjlen: diameter 2,6 cm, længde 30 cm).

Eluatet optages i fraktioner på 10 ml.

Elektronmikroskopisk undersøgelse viser, at de sidste af fraktionerne indeholder liposomet.

Den fraktion, som skal undersøges, fortyndes med samme volumen af en vandig 2% opløsning af ammoniumsaltet af phosphorwolframsyre mindst 30 minutter før målingen.

Man anbringer 10 mikroliter af fortyndingen på et gitter af guld, som er overtrukket med en kollodiumfilm.

Efter en indvirkningstid på 30 sekunder tørres gitteret med filterpapir, og præparatet er herefter færdigt til undersøgelse.

Trin 1:

Felt af blærer, dispersion med adskilte blærer, størrelse 150 til 300Å.

Trin 2:

Forekomst af blæreophobninger.

Trin 3 og 4:

Sammensmeltning af blærerne.

Trin 5:

Tilbagevending til ordnet lamelfase.

Overgangen fra trin 1 til trin 4, dvs. spredning af disse liposomer, sker hurtigt (i løbet af 24 timer).

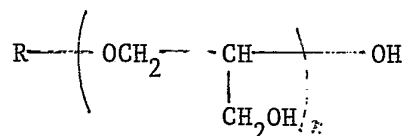
I den klare, blålige udgangsdispersion viser liposomernes adskillelse sig i makroskopisk målestok ved forekomst af spiraler eller ruller og derpå ved dannelse af sammensmeltede blæreophobninger.

II. Ikke-ionisk liposom-dispersion (Niosom).

Formuleringen omfatter 80% niosom, 10% cholestantriol og 10% dicetylphosphat.

Fremstilling af den ikke-ioniske liposom-dispersion.

I en 50 ml rundbundet kolbe opløses 400 mg af produktet med formelen



50 mg cholestantriol og 50 mg natriumdicetylphosphat i 3 ml af en 2:1-blanding af chloroform og methanol.

Opløsningsmidlet afdampes ved hjælp af en rotationsfordamper, og de sidste spor heraf fjernes, idet blandingen holdes en time under reduceret tryk.

Den opnåede lipidfilm tilsættes 8 ml af en vandig 0,3 molær glukoseopløsning. Forsøget gennemføres ved en temperatur på 70°C.

Kolben stilles på et rysteapparat og røres 2 timer kraftigt ved 70°C, hvorpå den afkøles til omgivelsernes temperatur. Derpå underkaster man dispersionen behandling med ultralyd i 20 minutter ved en temperatur, som ved hjælp af et is-vandbad holdes under stuetemperatur, idet behandlingen sker ved direkte kontakt med lydsonden.

Den med ultralyd behandlede opløsning fortyndes derpå i destilleret vand til en lipidkoncentration på 1% og fortyndes derpå atter i et volumenforhold på 1:1, mindst 30 minutter før målingen, med en 2%’s opløsning af ammoniumsaltet af phosphorwolframsyre.

Man anbringer 10 mikroliter af denne fortynding på et guldgitter, som er dækket med en kollodioniumfilm. Efter en indvirkningstid på 30 sekunder tørres gitteret med et filterpapir.

8 dage efter fortynding af dispersionen i opløsningen af ammoniumsaltet af phosphorwolframsyren konstateres det, at der foreligger en dispersion af niosomer med ringe størrelse (300Å). Der iagttages hverken aggregation eller strukturforandringer af blærerne ved henstand i adskillige dage. Dispersionen er stabil i flere måneder.

Forsøg viser, at de ikke-ioniske liposomdispersioner (her liposom-diameter f.eks. 300Å) er væsentligt stabilere end de kendte ioniske liposomer med en diameter på op til 1000Å, specielt 500Å (jvf. tysk offentliggørelsesskrift nr. 22 49 552).

P A T E N T K R A V

1. Dispersion af småkugler, som består af molekulare lag af lipidforbindelser, som omslutter en vandig fase, k e n d e t e g n e t ved, at lipidforbindelserne er ikke-ioniske forbindelser med den almene formel



hvor X betegner en hydrofil polyoxyethylengruppe, polyglycerolgruppe eller oxyethyleret eller ikke-oxyethyleret polyolestergruppe, og Y betegner en lipofilgruppe, hvilke kugler har en diameter fra 100 til 50.000Å.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af dispersionen ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man blander i det mindste en i vand dispergerbar ikke-ionisk lipidforbindelse med den almene formel



hvor X betegner en hydrofil polyoxyethylengruppe, polyglycerolgruppe eller oxyethyleret eller ikke-oxyethyleret polyolestergruppe, og Y betegner en lipofil gruppe, og den vandige fase, som skal indesluttet i kuglerne, idet lipidets lipofil/hydrofil-forhold vælges således, at lipidet kvædes i den vandige fase, som skal indesluttet, under dannelse af en lamelagtig fase, hvorpå man tilsætter en dispergeringsvæske i overskydende mængde til den lamelagtige fase, som opnås og ryster kraftigt i fra 15 minutter til 3 timer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, $k e n d e t e g n e t$ ved, at man benytter et vægtforhold mellem den vandige fase, der skal indesluttet og det eller de lipider, som danner den lamelagtige fase, på fra 0,1 til 3.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2 eller 3, $k e n d e t e g n e t$ ved, at man arbejder ved en temperatur, som i det mindste er så høj som smeltetemperaturen af det eller de lipider, hvormed der arbejdes.