



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **303205**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ A 61 K 9/127

Patentstyret

(21) Søknadsnr	913816	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	28.03.90, PCT/US90/01646
(22) Inng. dag	27.09.91	(85) Videreføringsdag	27.09.91
(24) Løpedag	28.03.90	(30) Prioritet	31.03.89, US, 332609
(41) Alm. tilgj.	26.11.91		05.04.89, US, 334055
(45) Meddelt dato	15.06.98		

(73) Patenthaver	The Regents of the University of California, 300 Lakeside Drive, 22nd Floor, Oakland, CA 94612-3550, US
(72) Oppfinner	Francis C. Szoka Jr., San Francisco, CA, US
(74) Fullmektig	Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for fremstilling av lipidkompleksoppslemming**

(56) **Anførte publikasjoner** NO B 174833
Concise Chemical and Technical Dictionary, 4th Ed., s. 628
Valduga et al., J. of Inorg. Biochemistry 29, 59-65 (1987)

(57) **Sammendrag**

Liposom- og lipidpartikkelpreparater av forbindelser fremstilles ved oppløsning i en løsning av liposomdannende lipider i et aprotisk løsningsmiddel såsom DMSO, eventuelt inneholdende en lipidsolubilisierende mengde av en lavere alkanol, og injesering av den resulterende løsning inn i en vandig løsning. Den resulterende liposom- eller lipidpartikkeloppslemming kan deretter dialyseres eller på annen måte oppkonsentreres. Denne fremgangsmåte er spesielt nyttig for forbindelser som er dårlig løselige i vandig løsning, men er vanligvis nyttig for en hvilken som helst forbindelse eller kombinasjon av forbindelser som kan løses i det aprotiske løsningsmiddel eller den aprotiske blanding av løsningsmiddel/-lavere alkanol.

Denne oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av en lipidoppslemming av definert partikkelstørrelse for innkapsling av en nyttig forbindelse.

Slike liposomoppslemminger kan avgi forbindelser som har dårlig løselighet i vann.

Liposomer er små vesikler sammensatt av amfipatiske lipider arrangert i sfæriske dobbeltsjikt. Liposomer klassifiseres vanligvis som små unilamellære vesikler (SUV), store unilamellære vesikler (LUV), eller multi-lamellære vesikler (MLV). SUV'er og LUV'er har pr. definisjon bare ett dobbeltsjikt, mens MLV'er inneholder mange konsentriske dobbeltsjikt. Liposomer kan anvendes til å innkapsle forskjellige stoffer, ved å fange inn hydrofile forbindelser i det vandige indre eller mellom dobbeltsjiktene, eller ved å fange inn hydrofobe forbindelser inne i dobbeltsjiktet.

Liposomer har mange forskjellige egenskaper avhengig av sin størrelse, sammensetning og ladning. F.eks. vil liposomer som har en liten prosentandel av umettede lipider gjerne være noe mere gjennomtrengelige, mens liposomer som inneholder kolesterol eller andre steroler gjerne vil være fastere og mindre gjennomtrengelige. Liposomer kan ha positiv eller negativ ladning eller være nøytrale, avhengig av den hydrofile gruppe. F.eks. gir cholin-baserte lipider en positiv ladning, fosfat- og sulfatbaserte lipider bidrar med en negativ ladning, og glycerolbaserte lipider og steroler er vanligvis nøytrale i løsning.

Liposomer er blitt anvendt til å avgi biologisk aktivt stoff. Se f.eks. Allison, U.S. pat. nr. 4.053.585, som beskriver administrering av flere antigener i negativt ladede liposomer, eventuelt omfattende avlivet *M. tuberculosis*. Fullerton et al., U.S. pat. nr. 4.261.975, beskriver anvendelse av separerte influensamembraner, med hemagglutinin-pigger festet til seg, og som er bundet til liposomer for anvendelse i influensavaksiner.

Liposomer er blitt anvendt til innkapsling av mange forskjellige forbindelser som har dårlig løselighet i vann,

eller som har uakseptabel toksisitet ved terapeutisk dosering. F.eks. er amfotericin B et antisopp-antibiotikum som er dårlig løselig i vann, alkoholer, kloroform og andre vanlige halogenkarbonløsningsmidler. Selv om amfotericin B er et effektivt fungicid, er det også farlig toksisk ved konsentrasjoner litt over den terapeutiske konsentrasjon. Innkapsling i liposomer synes å redusere in vivo-toksisiteten overfor pattedyrceller, mens den samtidig lar den fungicide aktivitet være relativt uforandret (F.C. Szoka et al. Antimicrob. Agents Chemother. (1987) 31:421-29). Virkningene på cytotoxicitet og fungicid aktivitet var avhengig av den spesielle liposomsammensetning, liposomstruktur (f.eks. SUV, MLV, etc.), og fremstillingsfremgangsmåten.

Fosfolipidvesikler (liposomer) kan dannes ved mange forskjellige teknikker som vanligvis begynner med "tørre" lipider som innføres i en vandig fase (D. Lasic, J. Theor. Biol. (1987) 124:35-41). Når lipidet først er hydratisert, dannes liposomene spontant. Det er blitt utviklet teknikker for å kontrollere antallet av lameller i liposomene, og for å frembringe en definert partikkelstørrelse. De tilgjengelige fremgangsmåter er tilfredsstillende for de fleste anvendelser hvor det behøves bare små stoffmengder (G. Gregoriadis, "Liposome Technology" I-III (Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc.), 1984). For fremstilling av vesikler i større skala kan lipidhydratiseringstrinnet imidlertid være en alvorlig begrensning for vesikkelproduksjonen.

For å akselerere lipidhydratiseringstrinnet kan lipidene løses i et organisk løsningsmiddel og injiseres i den vandige fase. Dette tillater kontinuerlig fremstilling av vesikler, siden løsningsmiddelet kan fjernes ved dialyse eller fordampning. Ved anvendelse av etanol som løsningsmiddel kan det dannes unilamellære liposomer av definert størrelse ved injeksjon (S. Batzri et al. Biochem. Biophys. Act. (1973) 298:1015-1019; J. Kremer et al, Biochemistry (1977) 16:3932-3935). Denne fremgangsmåte frembringer unilamellære vesikler så lenge som lipidkonsentrasjonen i etanolen er under 40 mM, og sluttkonsentrasjonen av etanol i den vandige oppslemming er

mindre enn ca. 10% (F. Boller, et al, EPO 87306202.0, registrert 14. juli 1987). Disse to faktorer begrenser konsentrasjonen av liposomer med definert størrelse som dannes ved etanolinjeksjon til ca. 4 mM. Dette er en ganske fortynnet løsning av liposomer; for vannløselige forbindelser er innkapslingseffektiviteten dårlig, mens det for lipidløselige forbindelser trenges store volumer for å oppnå en tilstrekkelig stoffmengde. På grunn av disse begrensninger har etanolinjeksjon ikke blitt bredt anvendt for fremstilling av lipidvesikler (D. Lichtenberg, et al, i "Methods of Biochemical Analysis", (D. Glick, utgiver, John Wiley & Sons, N.Y.) (1988) 33:337-462).

Lipidpartikler er komplekser av et amfipatisk lipid med et annet molekyl i et definert forhold som fører til en supramolekylær struktur eller partikkel. Hovedforskjellen mellom et liposom og en lipidpartikkel er at et liposom har et kontinuerlig dobbeltsjikt av lipid som omgir en vandig kjerne, hvilket en lipidpartikkel ikke har. På grunn av denne forskjell kan lipidpartikler i de fleste tilfeller ikke innkapsle vannløselige molekyler. Lipidpartikler kan ligge i størrelsesområdet fra ca. 5 nm til mer enn 1000 nm. Størrelsen av den endelige lipidpartikkel avhenger av sammensetningen og fremstillingsfremgangsmåten. Eksempler på lipidpartikler er lipidemulsjonene (S. Ljungberg et al, Acta Pharmaceutica Suecica (1970) 7:435-40), lipoproteiner (A. Gotto et al, Meth. Enzymol. (1986) 129:783-89), og iskoms (K. Lovgren et al, J. Immunol. Meth. (1987) 98:137-43).

Det beskrives en ny fremgangsmåte for fremstilling av liposomale oppslemminger inneholdende forbindelser som har dårlig løselighet i vann, alkoholer og halogenerte hydrokarbonløsningsmidler. Fremgangsmåten gir en høy, effektiv innkapslingshastighet. Dessuten er fremgangsmåten egnet for anvendelse i industriell fremstillingsskala, og kan praktiseres som en kontinuerlig fremgangsmåte. Andre betydelige fordeler ved denne fremgangsmåte omfatter: dannelse av høye konsentrasjoner av liposomer, preparater med definert diameter, enkelhet, hurtighet ved partikkeldannelsen,

grei oppskalering til store volumer, og mulighet for innkapsling av forbindelser som har dårlig vann/organisk løselighet, men høy løselighet i aprotiske løsningsmidler.

Fremgangsmåten består ifølge oppfinnelsen i å løse nevnte nyttige forbindelse og en innkapslingsmengde av et egnet lipid i en tilstrekkelig mengde av en løsningsmiddelblanding omfattende et ikke-halogenert aprotisk løsningsmiddel for å tilveiebringe en forbindelse/lipidløsning; og å presse nevnte forbindelse/lipidløsning gjennom en åpning av passende størrelse inn i en vandig løsning for å danne en lipid-forbindelsesoppslemming med definert partikkelstørrelse.

Denne fremgangsmåte er egnet for kontinuerlig fremstilling. Den resulterende liposomale oppslemming kan dialyseres eller konsentreres på annen måte, om ønsket.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 viser effekten av rørehastighet på liposomdiameter, som beskrevet i Eksempel 1.

Fig. 2 viser virkningen av injeksjonshastighet på liposomdiameter.

Fig. 3 viser virkningen av injeksjonsvolum på liposomdiameter.

Fig. 4 viser virkningen av vandig løsningsvolum på liposomdiameter.

Fig. 5 viser virkningen av økende aprotisk løsningsmiddelvolum (ved konstant lipidkonsentrasjon og vandig løsningsvolum) på liposomdiameter.

Fig. 6 viser virkningen av vandig løsningstemperatur på liposomdiameter.

Fig. 7 viser virkningen av ionestyrken i den vandige fase på liposomdiameter.

Fig. 8 viser virkningen av sammensetningen av løst stoff i den vandige løsning på liposomdiameteren.

Fig. 9 viser virkningen av ureakonsentrasjoner i den vandige løsning på liposomdiameteren.

Fig. 10 viser virkningen av den vandige løsnings-pH på liposomdiameteren.

Fig. 11 viser virkningen av forholdet av EtOH til DMSO på

liposomdiamteren.

Fig. 12 viser virkningen av EtOH-konsentrasjonen etter injeksjon på liposomdiamteren.

Fig. 13 viser virkningen av forskjellige alkanol/DMSO-blandinger på liposomdiamteren.

Fig. 14 viser virkningen av forskjellige aprotiske løsningsmidler med EtOH på liposomdiamteren.

Fig. 15 viser virkningen av lipidkonsentrasjonen på liposomdiamter for EtOH og tre DMSO/alkanolblandinger.

Fremgangsmåter for utførelse av oppfinnelsen

Definisjoner

Betegnelsen "dårlig løselig forbindelse" som anvendt heri refererer til forbindelser som synes å være svakt løselige eller i alt vesentlig uløselige (mindre enn ca. 1 mg/ml) ved fysiologisk temperatur og pH i standard-løsningsmidler.

"Standard-løsningsmidler" omfatter vann og vandige løsninger, lavere alkoholer (f.eks. metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanoler, t-butanol, og lignende), og halogenerte hydrokarboner (f.eks. diklormetan, kloroform, 1,1,1-triklor-etan, og lignende). Egnede dårlig løselige forbindelser omfatter cis-platin, doksorubicin, epinefrin, mebendazol, niridazol, polyenantibiotika, såsom amfotericin B, nystatin, og primaricin, og lignende.

Betegnelsen "egnet lipid" som anvendt heri refererer til en amfipatisk forbindelse som er i stand til å danne liposom, og er i alt vesentlig ikke-toksisk når den administreres ved de nødvendige konsentrasjoner som liposomer. Egnede lipider har vanligvis en polar eller hydrofil ende, og en ikke-polar eller hydrofob ende. Egnede lipider omfatter uten begrensning egg-fosfatidylcholin (EPC), egg-fosfatidylglycerol (EPG), dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC), kolesterol (Chol), kolesterolsulfat og dets salter (CS), kolesterol hemisuksinat og dets salter (Chems), kolesterolfosfat og dets salter (CP), kolesterolfthalat, kolesterylfosforylcholin, 3,6,9-trioksooktan-1-ol-cholesteryl-3e-ol, dimyristoylfosfatidylglycerol (DMPG), dimyristoylfosfatidylcholin (DMPC), hydrogenert

soyafosfatidylcholin (HSPC), og andre hydroksy-kolesterol- eller aminokolesterolderivater (se f.eks. K.R. Patel et al, Biochim. Biophys. Acta. (1985) 814:256-64).

Betegnelsen "innkapslingsmengde" refererer til den lipidmengde som er nødvendig for å innkapsle den dårlig løselige forbindelsen og danne liposomer eller lipidpartikler av passende størrelse. Fortrinnsvis er den gjennomsnittlige liposom- eller lipidpartikkelstørrelse mindre 1000 nm i diameter, mere fortrinnsvis ca. 20-600 nm. Innkapslingsmengden vil avhenge av den spesielle forbindelse og prosessbetingelser som velges, men vil vanligvis ligge i området fra ca. 2:1 til ca. 1:100 forbindelse:lipid, fortrinnsvis ca. 1:1 til ca. 1:20.

Betegnelsen "lipidforbindelseoppslemming med definert partikkelstørrelse" refererer generisk til komplekser som er dannet ifølge oppfinnelsen utifra et egnet lipid og en forbindelse som skal innkapsles eller komplekseres. Lipidforbindelseoppslemminger med definert partikkelstørrelse omfatter liposomer og lipidpartikler som har en partikkelstørrelsefordeling av størrelsesorden <1000 nm i diameter, fortrinnsvis 20-600 nm.

Betegnelsen "lipidpartikkel" som anvendt heri refererer til partikler med udefinert struktur som består av et egnet lipid og en innkapslet eller kompleksert forbindelse. Polyenantibiotika med høyt antibiotikum:lipidforhold danner typisk lipidpartikler heller enn liposomer, på grunn av polyenstrukturen og dens interaksjon med lipidet. Lipidpartikler kan ha en lamell-struktur, men det er ikke nødvendig at de har noen definerbar struktur. Disse partiklers struktur er for tiden ukjent.

Betegnelsen "aprotisk løsningsmiddel" som anvendt heri refererer til løsningsmidler som ikke er hydrogendonorer, og som ikke omfatter hydrokarbon- eller halogenerte hydrokarbonløsningsmidler. Egnede aprotiske løsningsmidler omfatter dimetylsulfoksyd (DMSO), dioksan, dimetylformamid (DMF), acetonitril, 1,2-dimetoksyetan (DME), N,N-dimetylacetamid (DMA), sulfolan, gamma-butyrolakton, 1-metyl-2-

pyrrolidinon (MP), og metylpyrrolin, fortrinnsvis DMSO.

Betegnelsen "lavere alkanol" refererer til forbindelser med formelen R-OH, hvor R er et fullstendig mettet hydrokarbonradikal med fra ett til seks karbonatomer. Egnede lavere alkanoler omfatter metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol og lignende. Etanol og metanol blir for tiden foretrukket, spesielt etanol.

Blandingene blir fremstilt ifølge oppfinnelsen ved å løse en forbindelse med dårlig løselighet i et aprotisk løsningsmiddel, sammen med en innkapslende mengde av et egnet lipid. Løsningen med det aprotiske løsningsmiddel kan dessuten inneholde en lavere alkanol om nødvendig for å solubilisere lipidet. Den resulterende løsning ekstruderes deretter inn i en vandig løsning under omrøring, slik at det dannes en oppslemming av liposom- eller lipidpartikler. Oppslemmingen kan om ønsket dialyseres eller på annen måte konsentreres.

Det aprotiske løsningsmiddel velges fra dimetylsulfoksyd (DMSO), dioksan, dimetylformamid (DMF), acetonitril, 1,2-dimetoksyetan (DME), N,N-dimetylacetamid (DMA), sulfolan, gamma-butyrolakton, 1-metyl-2-pyrrolidinon (MP), og metylpyrrolin. DMSO blir for tiden foretrukket.

Lipidkonsentrasjonen i løsningen med det aprotiske løsningsmiddel vil variere avhengig av det spesielle lipid eller den lipidblanding som velges. Ved paktisering av den foreliggende oppfinnelse kan man imidlertid anvende lipidkonsentrasjoner i området fra ca. 2 mM til ca. 400 mM, fortrinnsvis ca. 40-120 mM. Lipidløsningen inneholder fortrinnsvis en lavere alkanol, fortrinnsvis etanol eller metanol, i et forhold på ca. 1:2 til 8:1 aprotisk løsningsmiddel:alkanol. For tiden foretrukne løsningsmiddelforhold er 1:1 til 7:3 DMSO-EtOH.

Den dårlig løselige forbindelse velges på grunn av sin løselighet i det aprotiske løsningsmiddel eller den blanding av aprotisk løsningsmiddel/lavere alkanol som anvendes. Forholdet av forbindelse til lipid som anvendes, kan ligge i området fra ca. 2:1 til ca. 1:100 forbindelse:lipid, fortrinnsvis ca. 1:1 til ca. 1:20, avhengig av den anvendte

forbindelse. Med forbindelser av polyentypen såsom amfotericin B, foretrekkes for tiden forhold på ca. 1:1. Vannløselige forbindelser blir løst eller oppslemmet i den vandige fase i en konsentrasjon som egner seg for det ønskede forhold forbindelse:lipid.

Løsningen av forbindelse/lipid blir deretter ekstrudert eller injisert inn i en dertil egnet vandig løsning. Ekstruderingsinnretningen kan være en sprøyte, perforert plate eller rør, eller en annen egnet anordning som gir åpninger på ca. 0,05 mm til ca. 5 mm, fortrinnsvis ca. 0,8 mm. Det kan også anvendes en sintret skive som har en 0,1-50 μm nominell retensjonsstørrelse. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er ikke følsom for ekstruderingshastigheten; en hastighet på ca. 0,5-10 ml/min./åpning blir antydnet for letthets skyld. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er heller ikke spesielt følsom overfor rørehastighet. Den vandige løsning omrøres imidlertid fortrinnsvis ved en hastighet på minst 150 opm. For de lipidløselige forbindelser kan den vandige løsning inneholde små mengder bufferforbindelser, konserveringsmidler og lignende, men ionestyrken bør ikke overskride den som oppnås med ca. 1 M NaCl, fortrinnsvis ikke overskride ionestyrken for en løsning med ca. 0,1 M NaCl, mere fortrinnsvis ikke overskride ionestyrken for en løsning på ca 10 mM NaCl. Temperaturen i den vandige fase vil vanligvis være mellom overgangstemperaturen for de anvendte lipider, og kokepunktet for blandingen av aprotisk løsningsmiddel/alkanol. Fortrinnsvis vil temperaturen være i området fra ca. 25-80°C, mere fortrinnsvis ca. 30-60°C. Lipidløsningens temperatur kan ligge i området fra frysepunktet for blandingen av aprotisk løsningsmiddel/alkanol til dens kokepunkt, men er vanligvis fortrinnsvis ca. omgivende temperatur. Den vandige løsningens volum er ikke spesielt kritisk for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, og holdes fortrinnsvis så liten som mulig for å lette oppkonsentreringen av liposomene eller lipidpartiklene etter dannelsen. Vanligvis kan forholdet av lipidløsning til vandig løsning ligge i området fra ca. 1:25 til ca. 1:1, fortrinnsvis ca. 1:10 til ca. 1:15.

Om ønsket kan den oppnådde oppslemming av liposom- eller lipidpartikler konsentreres ved standardteknikker, omfattende sentrifugering, dialyse, diafiltrering, motstrømsdialyse og lignende.

Oppslemmingene anvendes på en måte som egner seg for den dårlig løselige innkapslede forbindelse. Når forbindelsen er en farmasøytisk aktiv forbindelse, blir oppslemmingene ifølge oppfinnelsen fortrinnsvis administrert parenteralt, f.eks. ved intramuskulær, subkutan eller intravenøs injeksjon. Andre administreringsmåter omfatter intraokulære dråper, intranasal spray eller dråper, lokale salver og lignende.

Eksempler

De eksempler som er vist nedenfor er gitt som en ytterligere rettesnor for en utøver med vanlig dyktighet på dette området, og skal ikke oppfattes som begrensende for oppfinnelsen på noen måte.

Fremgangsmåter og forbindelser

I eksemplene fremsatt nedenfor ble det levert egg-fosfatidylcholin (EPC), egg-fosfatidylglycerol (EPG), dipalimitoyl-fosfatidylcholin (DPPC) fra Sigma Inc., St. Louis, Mo., som kloroform/etanolløsninger. Kolesterol (Chol), kolesterolsulfat (natriumsalt) (CS), og kolesterolhemisuksinat (Tris salt) (Chems) ble levert fra Sigma som tørre pulvere. I noen eksperimenter ble den leverte EPC, dimyristoyl-fosfatidylglycerol, dimyristoyl-fosfatidylcholin og hydrogenert soya-fosfatidylcholin (HSPC) levert fra Natterman, Köln, som tørre pulvere. Tynnsjikt-kromatografi på silika gel 60 (Merck) i et løsningsmiddelsystem av kloroform/metanol/vann (65/25/4) ved høye lipidbelastninger viste bare én komponent for hvert av fosfolipidene ovenfor. DL- α -tokoferol var fra Serva. Cis-platinum var et produkt fra Bristol Myers, Syracuse, N.Y. Doksorubicin ble levert fra Farmitalia som lyofilisert pulver inneholdende laktose. 1-metyl-2-pyrrolidinon (MP), 1,2-dimetoksyetan (DME), gamma-butyrolakton, laktose, urea, amfotericin B (AmpB), nystatin og primaricin ble levert fra Sigma. Andre kjemikalier var av reagenskvalitet. Løsningsmidlene, unntatt som bemerket ovenfor, ble levert fra

Merck og var av puriss- eller HPLC-kvalitet. Absolutt etanol (EtOH) var fra Merck. Dobbeltdestillert avionisert vann ble anvendt ved fremstilling av alle løsninger.

Fremstilling av lipidstamløsninger

Lipider ble enten innveiet i en rundbunnet flaske med kjent vekt eller utfølt fra kloroform/etanolløsningen ved å fjerne løsningsmiddelet på en rotasjonsfordamper. Lipidene ble plassert under høyvakuum ved romtemperatur i 24 timer. Flaskene ble veiet om igjen etter denne periode, og gjort opp til standardvolum med tørr etanol i en volumetrisk flaske for å oppnå stamlipid-konsentrasjonene. En klar stamløsning av egg-fosfatidylcholin inneholdende 0,05 mol-% tokoferol under nitrogenatmosfære ble vanligvis fremstilt som 300-400 mM ved oppvarming av etanolløsningen til 60°C. DPPC og HSPC ble løst under oppvarming til 300 mM konsentrasjon. Ved denne konsentrasjon dannet HSPC en gel når temperaturen ble redusert til 20°C. Vannfrie løsningsmidler ble anvendt ved fremstilling av alle lipidløsninger, og det ble tatt forholdsregler for å minimalisere eksponering av løsningene mot atmosfæren. Når det ble anvendt andre alkoholer såsom metanol (MeOH), propanol, isopropanol og tertiær butanol, ble egg-fosfatidylcholin løst ved 400 mM ved oppvarming til 60°C. Blandinger av alkohol-lipidstamløsningen med de forskjellige andre løsningsmidler var på v/v-basis ved pipettering av den alkoholiske lipidløsning til en volumetrisk flaske og tilsetning av det andre løsningsmiddelet til det angitte merke. Kolesterol ble fremstilt i etanol ved 100 mM ved oppvarming til 60°C; når den ble avkjølt til romtemperatur ville den krystallisere fra løsningen. For visse eksperimenter ble kolesterol løst i 1-metyl-2-pyrrolidinon i en konsentrasjon på 364 mM. Kolesterolulfat og Chems ble løst i dimetylsulfoksyd (DMSO) i en konsentrasjon på 71 mM. Blandinger av lipider ble fremstilt utifra stamløsningene på volum til volumbasis. Lipidstamløsningene ble lagret under nitrogenatmosfære ved -20°C. Fosfolipidkonsentrasjonen i de endelige liposompreparater ble bestemt ved måling av fosforkonsentrasjonen etter syreoppslutning som beskrevet (G.

Bartlett, J. Biol. Chem. (1959) 234:466-468.

Injeksjonssystem

En reaksjonsbeholder av glass med vannkappe og med et volum på 15 ml ble anvendt til å oppta den vandige fase. Beholderens temperatur ble holdt ved 30°C, dersom intet annet er angitt, ved å sirkulere vann fra et temperaturkontrollert vannbad. Beholderen ble plassert på en magnetrører, og en 1 cm magnetrørestav ble plassert på bunnen av reseptorrommet. Rørestavens omdreiningshastighet ble kontrollert med reostaten på magnetrøreren og ga kontinuerlig blanding opp til ca. 1000 omp. Typiske betingelser for løsningsmiddelinjeksjonen var som følger: 3 ml vandig reseptorfase ble plassert i beholderen, og magnetrøreren ble rotert ved 750 opm. Den vandige fase fikk komme til likevekt ved den nødvendige temperatur. En 0,5 ml gasstett Hamilton-sprøyte med teflonstempel ble anvendt for injeksjoner som krevet mindre enn 0,5 ml. En 3 ml plastsprøyte ble anvendt for injeksjoner som krevet mellom 0,5 ml og 3,0 ml. Sprøyten ble plassert midt i beholderen, direkte over magnetrørestaven, og spissen på sprøytenålen (25 gauge) ble plassert under den vandige fase og ca. 2-4 mm over rørestaven. I et typisk eksperiment ble det injisert 0,3 ml lipidløsning i løsningsmiddelet ved en hastighet på 3,6 ml/min. (5 sekunder). Dette arrangement ga svært rask og inngående blanding av lipidløsningen med den vandige løsning. Blandingen kunne observeres ved å plassere et fargestoff i lipidløsningen og injisere den i den vandige fase. Lipidoppslemmingen ble omrørt i 5 min., deretter fjernet fra beholderen og plassert i en dialysepose. Prøven ble dialysert mot 100 volumer av egnet buffer, utskiftet to ganger i løpet av en 24 timers periode. Det viser seg at systemet er ganske robust, og forskjellige injeksjonsbetingelser gir vesikler med lignende diameter over et bredt område av rørehastigheter, injeksjonshastigheter, temperaturer, reseptorvolumer og vann:løsningsmiddelforhold.

Bestemmelse av vesikkeldiameter

Vesikkeldiameteren ble målt ved dynamisk lysspredning ved anvendelse av en helium-neon 100 mW NEC gasslaser og en

Malvern K7027 korrelator. Det ble utført minst tre målinger for hver bestemmelse. Diameteren og polydispersiteten ble gjengitt som gjennomsnittet av de tre bestemmelser.

Eksempel 1

(Parametere for liposomdannelsen)

Følgende eksperimenter ble gjennomført for å bestemme virkningene av prosessparameterne på de endelige liposomprodukter.

(A) Effekten av injeksjonsbetingelser

Injeksjonssystemet ble først undersøkt ved anvendelse av et fargestoff løst i løsningsmiddelblandingen. Det ble observert at plassering av sprøytespissen i den vandige fase direkte over magnetrørestaven ga rask blanding. Når 0,2 ml av en 70 mM EPC-løsning i DMSO:EtOH (7:3) ble injisert i 2 ml vann, oppsto det en svakt opaliserende oppslemming så snart som løsningsmiddelet blandet seg. Når det ikke ble rørt om, ble vesikkeldiameteren 152 nm. Ettersom rørehastigheten ble økt til 250 opm, ble vesikkeldiameteren redusert til 71 nm (Fig. 1). Diameteren til de resulterende vesikler holdt seg konstant når rørehastigheten ble ytterligere økt til 750 opm (Fig. 1). I alle følgende eksperimenter ble rørehastigheten derfor opprettholdt ved 750 opm.

Diameteren til de resulterende liposomer var relativt upåvirket av injeksjonshastigheten fra 0,4 ml/min. til 6 ml/min. (Fig. 2). I alle påfølgende eksperimenter var injeksjonshastigheten mellom 2-6 ml/min.

Når volumet av den vandige fase var konstant, men mengden av lipidet og løsningsmiddelet økte, ble det knapt noen forandring i diameteren på de resulterende vesikler (Fig. 3). Når volumet av den vandige fase ble økt fra 2 ml til 5 ml, men forholdet av løsningsmiddel til vandig fase og sluttkonsentrasjonen av lipid ble holdt konstant, viste vesikkeldiameteren en svak reduksjon fra 68 nm til 48 nm (Fig. 4). I alle påfølgende eksperimenter var det vandige volum minst 3 ml og i de fleste tilfeller 4 ml.

Dersom den injiserte lipidemngde og den vandige fase

holdt seg konstant, men det injiserte løsningsmiddelvolum økte, ble diameteren til de resulterende vesikler uforandret (Fig. 5). Dette er til tross for det faktum at ved den høyeste konsentrasjon som ble testet, inneholdt sluttblandingen etter injeksjonen 50% løsningsmiddel.

I disse eksperimenter ble temperaturen i den vandige fase holdt ved 30°C. Variasjon av temperaturen i den vandige fase fra 30 til 80°C hadde imidlertid bare en svak virkning på diameteren av de resulterende vesikler (Fig. 6). I alle de påfølgende injeksjonseksperimenter ble temperaturen på den vandige fase regulert ved 30°C. Lipidene i løsningsmiddelblandingen ble anvendt ved romtemperatur (20-24°C).

De første eksperimenter viste således at diameteren på vesiklene som ble dannet under løsningsmiddelinjeksjonsfremgangsmåten var relativt upåvirket av et stort antall variable som forståelig nok kunne påvirke injeksjonssystemet. Basert på disse resultater ble standardinjeksjonsbetingelsene som følger: lipid ble injisert med en hastighet på 2-6 ml/min. i et 3-4 ml vandig volum ved 30°C og omrøring ved 750 opm. slik at det endelige forhold løsningsmiddel til vann var mellom 0,075 og 0,33. Det at fremgangsmåten er så robust gjør det lett å sette den opp med vanlig laboratorieutstyr.

(B) Innflydelse av vandig fase

I mange fremgangsmåter for fremstilling av liposomer kan egenskapene til den vandige fase under dannelsen av liposomet, såsom ionestyrke, pH og buffertyper, påvirke de resulterende liposomegenskaper (Lichtenberg, supra). Et lineært forhold ble observert ($r^2=0,88$) mellom vesikkeldiameter og logaritmen til NaCl-molariteten (Fig. 7). Denne tydelige virkning av ionesyrken på vesikkeldiameteren ble observert begge de ganger den fullstendige titrering fra 0,001 til 1,0 mM salt ble utført. Det var et konsistent resultat at når to eller flere preparater ble sammenlignet, hadde de vesikler som ble dannet i den vandige fase med høyere ionestyrke større diametere, når alle andre betingelser var de samme.

Når ikke-ioniske løste forbindelser (glycerol, laktose eller urea) ble satt til den vandige fase, var det ingen

virkning på vesikkeldiameteren (Fig. 8), selv om ureakonsentrasjonen ble øket fra 0 til 8 M (Fig. 9). Dette antyder at salteffekten skyldes en forandring i ionestyrken, og ikke en forandring i den vandige oppslemmingens osmolaritet.

Forandringer i den vandige fasens pH fra pH 10 til pH 4, ved en relativt konstant ionestyrke, hadde liten virkning på vesikkeldiameteren (Fig. 10). Vesikler dannet ved pH 2,0 var imidlertid betydelig mindre enn vesikler dannet ved de høyere pH-verdier.

(C) Løsningsmiddelblandingens innflydelse

Foreløpige eksperimenter viste at løsningsmidlenes karakter og lipidkonsentrasjonen i løsningsmiddelblandingen påvirket både utseendet av lipidopslemmingen og vesikkeldiameteren målt ved lysspredning. Virkningen av disse to parametere ble undersøkt ved den maksimale lipidkonsentrasjon (40 mM) hvor EtOH-injeksjonsfremgangsmåten ble angitt å gi unilamellære vesikler (Kremer et al, Biochemistry (1977) 16:3932-35) og ved lipidkonsentrasjoner to til tre ganger høyere. Forandring av forholdet DMSO:EtOH fra 8:2 til absolutt EtOH hadde ingen signifikant virkning på de resulterende vesikkeldiameterer (Fig. 11).

I den klassiske EtOH-injeksjonsteknikk (Batzri, supra; Kremer, supra) var det slik at sluttprosenten av EtOH i den vandige fase ved konstant lipid injisert, påvirket diameteren på de resulterende vesikler. Denne virkning kan sees i Fig. 12 hvor vesikkeldiameteren forandres ettersom prosentensatsen av EtOH i den resulterende oppslemming øker. Til sammenligning hadde vesikler dannet utifra en DMSO:EtOH-blanding ved den samme lipidkonsentrasjon ved en endelig løsningsmiddel-prosenten på 7,5, en diameter på 93 nm sammenlignet med 483 nm for den rene EtOH. Som bemerket ovenfor, vil en økning av den endelige løsningsmiddel-prosenten til 50% når DMSO:EtOH-blandingen ble anvendt som løsningsmiddel, knapt forandre vesikkeldiameteren (Fig. 5).

Siden et DMSO:EtOH-forhold på 2:1 kunne solubilisere lipidene ganske godt, undersøkte man virkningene av å forandre

alkoholen ved høy lipidkonsentrasjon på vesikkeldiameteren (Fig. 13). Ved denne lipidkonsentrasjon ga EtOH og MeOH blandet med DMSO vesikler med den minste diameter, henholdsvis 114 nm og 154 nm. Propanol- og isopropanol-DMSO-blandinger ga vesikler med signifikant større diameter (henholdsvis 295 nm og 254 nm). Endelig ga tertiær butanol:DMSO-blandinger vesikler med den største diameter, 832 nm. De sisnevnte tre løsningsmiddelblandinger ga vesikkeloppslemminger som sedimenterte etter dialyse. En undersøkelse av disse tre under mikroskopet åpenbarte en blanding av små strukturer og større strukturer som hadde det klassiske MLV-utseende (A. Bangham et al, J. Mol. Biol. (1965) 13:238-252).

Det aprotiske kosolvent som ble anvendt med etanol, påvirket også diameteren på de resulterende vesikler (Fig. 14). DMSO som kosolvent ga vesikler med den minste diameter (113 nm). Dioksan, dimetylformamid, acetonitril og 1-metyl-2-pyrrolidinon ga vesikler i diameterområdet 160-200 nm. Lipidløsninger i tetrahydrofuran/EtOH og ren EtOH ga vesikler med diametere større enn 800 nm (Fig. 14). Etter dialyse var disse to sistnevnte liposomoppslemminger sammensatt av store MLV-lignende strukturer som ble aggregert i stor utstrekning ved betraktning under lysmikroskopet.

(D) Innvirkning av lipidkonsentrasjonen

En viktig parameter i den originale EtOH-injeksjonsfremgangsmåte var lipidkonsentrasjonen i EtOH (Kremer, supra). Virkningen av lipidkonsentrasjonen ble undersøkt i EtOH og tre DMSO:alkohol (2:1) løsningsmiddelblandinger: EtOH, MeOH og propanol (Fig. 15). Som bemerket ovenfor, når lipidkonsentrasjonen overskrider 40 mM i EtOH, øker den resulterende vesikkeldiameter betydelig (Kremer, supra). Vesikkeldiameterne var 83 nm ved 40 mM og 690 nm ved 121 mM. Selv om det ikke tidligere er nevnt, øker også preparatets polydispersitet fra 0,33 ved 40 mM til 0,69 ved 121 mM. DMSO/propanolblandingen ga også en signifikant økning i vesikkeldiameteren og polydispersiteten (0,24 til 0,59) for preparatet, når lipidkonsentrasjonen økte til 121 mM. DMSO/EtOH- og DMSO/MeOH-blandingene dannet vesikler med

diameter på ca. 50 nm ved den laveste anvendte lipid-konsentrasjon, til ca. 150 nm ved den høyeste lipidkonsentrasjonen (Fig. 15). Vesikkelpreparatenes polydispersitet over dette samme lipidkonsentrasjonsområde varierte fra 0,250 til 0,370 for de EtOH- og MeOH-holdige løsningsmiddelblandinger.

Økningen i vesikkeldiameterne som målt ved lysspredningen ved de høyere lipidkonsentrasjoner (Fig. 15) blir også reflektert i preparatenes utseende. En svært uklar oppslemming er synlig med EtOH- og propanol/DMSO-blandingene ved 121 mM lipid, og en mye mindre sløret oppslemming oppstår med EtOH/DMSO- og MeOH/DMSO-blandingene etter injeksjon.

Eksempel 2

(Innkapsling av doksorubicin)

En viktig forbindelse for cancer-chemoterapi er doksorubicin. Flere forskere har vist at når denne forbindelse administreres som den liposominnkapslede form, reduseres dens toksisitet i dyr. Alle tidligere rapporterte liposonpreparater for innkapsling av doksorubicin har anvendt et tørt lipidhydratiseringstrinn, til tross for medikamentets lave løselighet i vann ved pH 7,4. Doksorubicin er svært løselig i DMSO, slik at det er naturlig å anvende DMSO-injeksjonsfremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Doksorubicin ble løst i DMSO og tilsatt til en etanol-løsning av EPG:EPC:Chol (7:3:6) for å gi en endelig doksorubicinkonsentrasjon på 6,2 mM og en endelig samlet lipidkonsentrasjon på 96,4 mM i en DMSO:EtOH (7:3) løsningsmiddelblanding. Lipidvesikler ble dannet ved å injisere 1 ml av lipid-doksorubicinblandingen i 2 ml av en vandig fase bestående av 140 mM NaCl-10 mM Tris-HCl, pH 4,0, ved 30°C. Lipidopslemmingen ble dialysert i 2 timer ved romtemperatur mot 100 volumer av 140 mM NaCl-10 mM Tris, pH 4,0 (NaCl-Tris). Det liposominnkapslede doksorubicin ble adskilt fra det ikke-innkapslede stoff ved kolonnekromatografi på en 1 x 40 cm Sephadex® G-50 kolonne eluert med NaCl-Tris. Den mengde doksorubicin som ble gjenvunnet i vesikkeltoppen

ble korregert for forandringer i volum under fremgangsmåten, og sammenlignet med den opprinnelige injiserte mengde for å oppnå en innkapslingseffektivitet. Doksorubicin-konsentrasjonen ble målt spektrofotometrisk ved 480 nm etter solubilisering av liposom/doksorubicinpreparatene med Triton® X-100 og oppvarming

Den resulterende vesikkeldiameter var 227 nm, og 41,2% av doksorubicinet var innkapslet i vesiklene.

Eksempel 3

(Fremstilling av polyenlipidkomplekser)

(A) Fremstillingen av amfotericin B liposomer eller lipidpartikler (R. New et al, Antimicrob. Chemoterap. (1987) 8:371-381; G. Lopez-Berestein et al, "Biophysics to Therapeutics" (M. Ostro, utgiver 1987) 253-76; F. Szoka et al, Antimicrob. Ag. Chemotherap. (1987) 31:421-429) har alltid bydd på tekniske problemer på grunn av den lave løselighet av polyenantibiotika i de fleste løsningsmidler (N. Rajagopalan et al, J. Parenteral Sci. Tech. (1988) 42:97-102). På grunn av den begrensede løselighet av polyenantibiotika i de fleste løsningsmidler, krevde tidlig fremstilling av preparatene store mengder løsningsmidler såsom metanol (Lopez-Berestein, 1987). For å redusere mengden av løsningsmiddel som anvendes ved fremstillingen, var amfotericin B i DMSO blitt tilsatt til tørkede lipidfilmer for å danne amfotericin B liposomer (Szoka, supra). Dette ga ikke preparater med liten diameter, og krevde betydelig ytterligere fremstillingstrinn, såsom ultralydbehandling, for å tilveiebringe en formulering som egner seg for anvendelse i dyr.

Utviklingen av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen har muliggjort enkel fremstilling av disse preparater. Ikke bare er polyenantibiotika løselige i DMSO, men det er også Chems og CholSO₄. Kolesterol er ytterst løselig i 1-metyl-2-pyrrolidinon. En løsningsmiddel-injeksjons-fremgangsmåte ble derfor anvendt til fremstilling av polyen/sterolkomplekser. Preparater som inneholdt opp til 5 mM amfotericin B ble lett fremstilt med flere formuleringer (Tabellene 1-4). Med

polyenantibiotika ble mer enn 90% av polyenet gjenvunnet i preparatene etter inngående dialyse for å fjerne ikke-assosiert medikament. Disse blandingene var enten 1:1 eller 1:2 forhold av polyen:lipid, slik at vekt-% av den aktive komponent i formuleringen er ganske høy. Komplekser med partikkeldiameter mindre enn 1000 nm kunne dannes fra kolesterol, Chems, og CholSO₄ (Tabell 1). Tre egnede komponentkomplekser inneholdende DPPC og Chems eller Chol ble også dannet (Tabell 2).

Tabell 1

Fremstilling av amfotericin B/enkelt-lipid-komplekser ved løsningsmiddelinjeksjon

Lipid & forhold ^a	Løsningsmiddel ^b	Vandig fase	Diameter ^c (nm)
Chol 1:1	DMSO:EtOH 7:3	10 mM Hepes	451
Chol 1:1	DMSO:MP 1:1	NaCl-Hepes	>1500
Chems 1:1	DMSO	NaCl-Hepes	>1500
Chems 1:1	DMSO	10 mM Hepes	90
Chems 1:1 ^d	DMSO	10 mM Hepes	160
CholSO ₄ 1:1	DMSO	NaCl-Hepes	>1500
CholSO ₄ 1:1	DMSO	10 mM Hepes	143
DPPC 1:1	DMSO:EtOH 7:3	NaCl-Hepes	>1500
DPPC 1:1	DMSO:EtOH 7:3	10 mM Hepes	>1500
DPPC 1:2	DMSO:EtOH 7:3	NaCl-Hepes	>1500

a. Forholdet amfotericin B:lipid.

b. Løsningsmiddelvolumet var 0,25 ml injisert i 3,0 ml av den angitte buffer ved 30°C. Bufferens pH var 7,4.

c. Partikkeldiameteren ble målt etter dialyse i dannelsesbufferen. Verdier større enn 1500 nm angir at det var tilstede partikler med stor diameter som ikke kunne måles nøyaktig ved dynamisk lysspredning. I alle tilfeller hvor diameterne var større enn 1500 nm, ble det observert utstrakt aggregering og sedimentering av preparatene i dialyseposen.

d. Løsningsmiddelvolumet var 1,0 ml injisert i 3,0 ml av den

angitte buffer.

Tabell 2

Fremstilling av amfotericin B/multiple lipid-komplekser
ved løsningsmiddelinjeksjon

Komponent- forhold ^a	Løsnings- middel ^b	Vandig fase	Diameter ^c (nm)
Chol:DPPC 1:1:1	DMSO:EtOH 7:3	10 mM Hepes	254
Chol:DPPC 1:1:1	DMSO:EtOH 7:3	NaCl-Hepes	>1500
Chems:EPC 1:1:1	DMSO:EtOH 7:3	NaCl-Hepes	>1500
Chems:DPPC 1:1:1 ^d	DMSO:EtOH 7:3	10 mM Hepes	92
Chems:DPPC 1:1:1 ^d	DMSO:EtOH 7:3	NaCl-Hepes	>1500
Chems:HSPC 1:1:1	DMSO:EtOH 7:3	NaCl-Hepes	>1500

a. Forholdet amfotericin B:lipid.

b. Løsningsmiddelvolumet var 0,25 ml injisert i 3,0 ml av den angitte buffer ved 60°C. Bufferens pH var 7,4.

c. Partikkeldiameteren ble målt etter dialyse i dannelsesbufferen. Verdier større enn 1500 nm angir at det er tilstede partikler med stor diameter som ikke kan måles nøyaktig ved dynamisk lysspredning. I alle tilfeller hvor diameteren var større enn 1500 nm, ble det observert utstrakt aggregering og sedimentering av preparatene i dialyseposen.

d. Temperaturen i den vandige fase var 30°C.

Løsninger av polyenantibiotikum amfotericin B (30 mM) og nystatin (50 mM) ble fremstilt i DMSO. Den vandige oppslemming av primaricin levert fra Sigma ble lyofilisert og slemmet opp igjen i forskjellige løsningsmidler. Primaricin var svært løselig i DMSO, men etter henstand ved romtemperatur i 2 timer dannet det seg et bunnfall som ikke kunne slemmes opp igjen ved oppvarming av løsningen. En stabil gul løsning av primaricin kunne fremstilles i en 1:1 løsningsmiddelblanding av DMSO:MP. Dette polyenantibiotikum ble kombinert med de forskjellige lipidene i en løsningsmiddelblanding av DMSO, DMSO:MP eller DMSO:EtOH (7:3) og deretter injisert i den vandige fase. De dannede preparater ble overført til en

dialysepose og dialysert mot 100 volumer destillert vann, utskiftet to ganger dersom intet annet er angitt. Forholdet mellom komponentene, nøyaktige løsningsmiddelblandinger og andre betingelser er gitt i resultatene. Prøver av preparatene ble løst i metanol, og polyen-konsentrasjonen bestemt spektrofotometrisk (Szoka et al., supra): amfotericin B ved 406 nm, nystatin ved 306 nm og primaricin ved 318 nm.

Preparater inneholdende polyenantibiotika var sensitive for ionestyrken, pH og forholdet løsningsmiddel til vandig fase i preparatet (Tabellene 1, 3, 4). Ved lav ionestyrke (10 mM buffer) ble det f.eks. oppnådd partikkeldiameterer mindre enn 700 nm. Når 0,1 M NaCl ble innbefattet i den vandige buffer og alle andre betingelser ble holdt konstant, ble partikkelstørrelsen større enn 1500 nm, og det ble observert utstrakt aggregering. Dette er en funksjon av polyenet, siden partikkeldiameterer mindre enn 200 nm ble oppnådd for flere av lipidene ved injeksjon av lipidet alene i NaCl-Hepes bufferen.

pH i reseptorfasen var også viktig for bestemmelse av partikkelstørrelsen. Når det gjelder Chems:polyenkompleksne, ble de minste partikkelstørrelser oppnådd ved $\text{pH} \geq 7$, mens for CholSO_4 :polyenkompleksene kunne det oppnås små diameterer ved pH 4,0 og ved $\text{pH} > 5$ (Tabellene 3, 4).

Tabell 3

Fremstilling av amfotericin B/lipidkomplekser
ved løsningsmiddelinjeksjon

Komponent- forhold ^a	pH ^b	Vandig fase	Diameter ^c (nm)
A:Chems 1:1.1	4,0	10 mM acetat	>1500
A:Chems 1:1.1	7,0	10 mM Hepes	111
A:Chems 1:1.1	8,0	10 mM Hepes	121
A:CholSO ₄ 1:1.1	2,0	10 mM glysin	>1500
A:CholSO ₄ 1:1.1	4,0	10 mM acetat	86,4
A:CholSO ₄ 1:1.1	5,0	10 mM sitrat	>1500
A:CholSO ₄ 1:1.1	7,0	10 mM Hepes	456
A:CholSO ₄ 1:1.1	8,0	10 mM Hepes	539
A:CholSO ₄ 1:1.1	10,0	10 mM glysin	615
A:CholSO ₄ 1:1.1	7,0	10 mM Hepes:8 M urea	64,8

- a. Forholdet amfotericin B:lipid.
 b. Løsningsmiddelvolumet var 0,3 ml av bufferen ved 30°C.
 c. Partikkeldiameteren ble målt etter dialyse i destillert vann. Verdier større enn 1500 nm angir at det er tilstede partikler med stor diameter som ikke kan måles nøyaktig ved dynamisk lysspredning. I alle tilfeller hvor diameterne var større enn 1500 nm, ble det observert utstrakt aggregering og sedimentering av preparatene i dialyseposen.

Med disse komplekser kunne forandring av forholdet mellom løsningsmiddel og vandig fase, som også økte konsentrasjonen av komponentene, forårsake en økning i partikkeldiameteren, som observert i tilfellet Ny:CholSO₄ (Tabell 4).

Tabell 4

Fremstilling av polyen/lipidkomplekser
ved løsningsmiddelinjeksjon

Komponent- forhold ^a	pH ^b	Vandig fase	Diameter ^c (nm)
Ny:CholSO ₄ 1:1.1	4,0	10 mM acetat	552
Ny:CholSO ₄ 1:1.1	8,0	10 mM Hepes	364
Ny:CholSO ₄ 1:1.1 ^d	8,0	10 mM Hepes	>1500
Ny:Chol 1:1	4,0	10 mM acetat	>1500
Ny:Chol 1:1	8,0	10 mM Hepes	>1500
Ny:Chems 1:1	4,0	10 mM acetat	>1500
Ny:Chems 1:1	7,0	10 mM Hepes	45
Ny:Chems 1:1	8,0	10 mM Hepes	47
Primaricin:			
Chol 1:1	7,4	10 mM Hepes	1052
Primaricin:			
Chems 1:1	7,4	10 mM Hepes	>1500

a. Forholdet polyen:lipid. Ny = nystatin.

b. Løsningsmiddelvolumet var 0,3 ml injisert i 3,0 ml av den angitte buffer ved 30°C.

c. Partikkeldiameteren ble målt etter dialyse i destillert vann. Verdier større enn 1500 nm viser at det er tilstede partikler med stor diameter som ikke kan måles nøyaktig ved dynamisk lysspredning. I alle tilfeller hvor diameterne var større enn 1500 nm, ble det observert utstrakt aggregering og sedimentering av preparatene i dialyseposen.

d. Løsningsmiddelvolum 1,0 ml injisert i 2,0 ml buffer.

Fordelen med injeksjonsfremgangsmåten for fremstilling av polyen:lipidkompleksene for chemoterapeutiske studier (T. Patterson et al., J. Infect. Dis. (1989) under trykking) er at når injeksjonsbetingelsene er etablert, kan fremgangsmåten lett skaleres opp. Når amfotericin B:CholSO₄-preparatet ble skalert opp fra 3 ml til 50 ml, ble det oppnådd den samme partikkelstørrelse i preparatet i større skala. En annen fordel er at partikkelstørrelser mindre enn 200 nm kan oppnås

med denne fremgangsmåte. Dette tillater filtersterilisering av de resulterende preparater.

(B) Andre kolesterolderivater kan anvendes til fremstilling av amfotericin B-lipidpartikler. F.eks. kan kolesterolfosfat, kolesterolfitala, kolesterolfosforylcholin, 3,6,9-trioksaoktan-1-ol-kolesteryl-3 α -ol, og andre hydroksy- eller amino-kolesterolderivater løses i DMSO, EtOH, metylpyrrolin eller MP, kombinert med amfotericin B i DMSO og injisert i buffer for å danne amfotericin B-lipidpartikler som har en diameter mindre enn ca. 700 nm.

Det ble fremstilt lipidløsninger ved anvendelse av dimyristylfosfatidylcholin:dimyristylfosfatidylglycerol (DMPC:DMPG, 7:3), kolesterolfosfocholin, kolesteroleat, kolesterolfosfat, kolesterylftalat og kolesterolsulfat i DMSO, DMSO/EtOH, og DMSO/metylpyrrolin, og ble kombinert med amfotericin B i DMSO for å danne løsninger 12,5 mM i hver komponent (lipid og antibiotikum, i 1:1 forhold). DMSO/metylpyrrolinblandningene dannet to faser, og ble emulgert umiddelbart før injeksjon.

En alikvot (0,3 ml) av hver blanding ble injisert i 2,7 ml av 10 mM Tris/laktatbuffer (pH 7,0, 0,1 mM EDTA) ved 30°C for å danne amfotericin B-lipidpartikler. Etter injeksjon ble blandingen omrørt i 5 minutter, overført til dialyseposer, og dialysert i 48 timer mot 100 volumer av 1 mM Tris/laktat (pH 7,0), byttet ut to ganger. Amfotericin B ble kvantitativt holdt tilbake i partiklene under disse betingelser. Lipidpartiklenes diameter ble bestemt ved laserlysspredning, og gjennomsnittsverdiene gjengitt i Tabell 5 nedenfor.

Tabell 5

Amfotericin B-lipidpartikler

Lipidblanding ^a	Løsningsmiddel	Partikkeldiameter (nm)
DMPC:DMPG (7:3)	DMSO/EtoH	149
kolesterol fosfocholin	DMSO/EtOH	659
kolesterol oleat	DMSO/metyl- pyrrolin	431
kolesterol fosfat	DMSO	182
kolesteryl ftalat	DMSO	126
kolesterol sulfat	DMSO	76

a. Hver blanding inneholdt amfotericin B i et forhold på 1:1 antibiotikum:lipid.

Eksempel 4

(Innkapsling av cis-platinum)

Cis-platinum (cis-platin) er en annen forbindelse med bred anvendelse i cancer-chemoterapien. Den er ytterst løselig i DMSO, og dannelsen av liposomer inneholdende cis-platinum ved DMSO-injeksjonsteknikken gikk greit. Liposomer med diameter mellom 100 og 220 nm ble dannet med mange forskjellige lipidblandinger (Tabell 6). Med de betingelser som her ble anvendt var sluttkonsentrasjonen av cis-platinum i liposomoppslemmingen ca. 100 µg/ml.

Cis-platinum ble løst i DMSO ved en konsentrasjon på 45 mg/ml og tilsatt til forskjellige lipidblandinger for å gi en sluttkonsentrasjon på 7,5 mg/ml (25 mM) i en lipidkonsentra-

sjon på mellom 90 og 135 mM i en DMSO:EtOH-blanding på 7:3. Testede lipidblandinger innbefatter EPC:Chems (2:1) 135 mM; EPC:EPG (7:3) 90 mM og EPC:EPG:Chol (7:3:6) 96,4 mM. Ved romtemperatur var lipidmedikament-blandingen svakt blakket; blandingen ble en klar løsning ved kort oppvarming til 60°C i vannbad. 1 ml av lipidmedikament-løsningen ble injisert i 2 ml av 150 mM NaCl-10 mM Hepes, pH 7,4 (NaCl-Hepes) ved 30°C. Liposomene ble dialysert mot 100 volumer av NaCl-Hepes ved romtemperatur i 2 timer, og deretter kromatografert på en 1 x 40 cm Sephadex® G-50 kolonne eluert med NaCl-Hepes. Cis-platinumkonsentrasjonen ble bestemt ved måling av platina-innholdet i atomabsorpsjonsspektrometer.

Tabell 6

Fremstilling av cis-platina-liposomer
ved løsningsmiddelinjeksjon

Komponenter	Innkapslings-effektivitet (%) ^a	Diameter (nm) ^b
EPC:EPG 7:3	7,4	169
EPC:EPG:Chol 7:3:6	6,9	109
EPC:Chems 2:1	14,5	216

a. Innkapslingseffektiviteten ble beregnet som den prosent av det opprinnelige cis-platinum som var tilbake i liposompreparatet etter kolonneseparasjonen. Sluttmengden av samlet lipid i den vandige fase etter kolonneseparasjonen var ca. 20 mM.

b. Partikkeldiameteren ble målt etter dialyse i 0,1 M NaCl-10 mM Hepes, pH 7,4.

Eksempel 5

(Administrasjon av amfotericin B)

Liposomer ble fremstilt med amfotericin B og kolesterol-sulfat som beskrevet i Eksempel 3. En immunosuppressiv neutropen kaninmodell av invasiv aspergilosis ble anvendt for å sammenligne lipidpartikkelpreparatet med fri amfotericin B.

28 kaniner ble immunundertrykket ved administrasjon av

cyklofosfamid og triamcinolon. Kaninene ble deretter utfordret med 10^6 *A. fumigatus*. Etter 24 timer ble kaninene delt i tre behandlingsgrupper: åtte kaniner fikk 4,5 mg/kg/døgn fri amfotericin B; fire kaniner fikk 7,5 mg/kg/døgn fri amfotericin B; fem kaniner fikk 6-9 mg/kg/døgn amfotericin B-lipidpartikler (tilsvarende 3-4,5 mg/kg/døgn amfotericin B); tre kaniner fikk 15 mg/kg/døgn amfotericin B-lipidpartikler (tilsvarende 7,5 mg/kg/døgn amfotericin B); og åtte kaniner var kontroller.

Akutt mortalitet (død i løpet av 24 timer etter medikamentadministrering) ble observert i 4/4 dyr som fikk 7,5 mg/kg fri amfotericin, og i 3/8 dyr som fikk 4,5 mg/kg fri amfotericin. Ingen akutt mortalitet ble observert i gruppene som fikk lipidpartikkelpreparater. Behandlingen ble fortsatt i 30 døgn for gruppen som ble behandlet med 4,5 mg/kg fri amfotericin B og gruppen som ble behandlet med 6-9 mg/kg lipidpartikler.

Ved slutten av behandlingsperioden ble dyrene avlivet, og lever, nyrer, lunger og hjerne undersøkt på levedyktig *Aspergillus* ved dyrkning av organene. Resultatene er gjengitt i Tabell 7 som antallet sterile organer (fri for *Aspergillus*) pr. total.

Tabell 7

Behandling av *Aspergillosis*

Organkulturer

(Antall sterile/total)

Gruppe	Lever	Nyre	Lunge	Hjerne
Kontroll	0/8	0/8	0/8	1/3
Fri AmpB ^a	5/5	5/5	3/5	1/5
Lipid-AmpB ^b	4/5	4/5	4/5	3/5

a. 4,5 mg/kg/døgn

b. 6-9 mg/kg/døgn

Resultatene viser av lipidpartikkelpreparatet var likeså effektivt som preparatet med fri amfotericin B, samtidig som

det ga signifikant lavere toksisitet.

Eksempel 6

(Innkapsling av vannløselige forbindelser)

(A) Innkapsling av natriumfosfonoformiat i liposomer av definert størrelse oppnås ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. En 80 mM løsning av trinatriumfosfonoformiat (Sigma Chemical Co.) anvendes som reseptorfase. 1 ml av lipidblandingen EPC/EPG/Chol (7:3:6) ved 96 mM i DMSO:EtOH (7:3) injiseres i 2 ml fosfonoformiatløsning. De resulterende liposomer dialyseres mot 100 volumer av 140 mM NaCl-10 mM Hepes-buffer (pH 7,4) ved 4°C, som byttes ut to ganger i løpet av en 24 timers periode. Forholdet medikament:lipid i sluttproduktet bestemmes ved anvendelse av måter som er kjent i teknologien (se f.eks. F. Szoka et al, Antimicrob. Agents Chemother. (1988) 32:858-64). Det dannes liposomer som har en diameter \leq 200 nm.

(B) Som vist i Eksempel 1(B) ovenfor, kan det anvendes mottagende faser som har mange forskjellige løste stoffer uten skadelig virkning på liposomdannelsen. Et hvilket som helst løst stoff som er tilstede i den mottagende fase blir innkapslet ved liposomdannelsen. Således kan det innkapsles svake syrer, svake baser, aminosyrer, chelateringsmidler og lignende. Løsninger med 140 mM natriumkarbonat, natriumhydrogenkarbonat, natriumacetat, natriumformiat, natriumsuksinat, mono-, di- og tri-natriumcitrat, natriumbenzoat, natriumsalicylat, EDTA, desferroksamin og lignende blir fremstilt og anvendt som reseptorfase. 1 ml lipidløsning (EPC, 120 mM) i DMSO:EtOH 7:3 injiseres i 2 ml av reseptorfase. De resulterende liposomoppslemminger dialyseres mot 100 volumer av 280 mM laktoseløsning, utskiftet to ganger, for å gi de innkapslede buffere.

(C) Aminosyrer innkapsles som følger: arginin, glycin, glutamat, lysin, histidin, prolin, eller andre aminosyrer blir fremstilt ved den ønskede konsentrasjon og pH i vandig løsning. 1 ml lipidløsning (EPC, 120 mM) i DMSO:EtOH 7:3 injiseres i 2 ml av aminosyreløsningen. De resulterende

liposomoppslemminger dialyseres mot 100 volumer av 280 mM laktoseløsning, utskiftet to ganger, for å gi de innkapslede aminosyrer.

(D) Flere forbindelser kan innkapsles samtidig. Forbindelsene kan være vannløselige, lipidløselige, eller kan være en blanding av vannløselige og lipidløselige forbindelser. F.eks. fremstilles en vandig aminosyreløsning inneholdende en forbindelse valgt fra glycin, arginin, ornitin, eller en annen aminosyre ved ca. 100 mM, og pH justert til 7,4. En lipidblanding (1 ml) inneholdende EPC (120 mM) og endoktoksinet lipid A (1 mM; J. Dijkstra et al, J. Immunol. (1987) 138:2663-71) blir injisert i 2 ml vandig fase, og den resulterende liposomoppslemming dialyseres mot 100 volumer av 0,14 M NaCl. Liposomene inneholder en aminosyre i den vandige fase, og lipid A i lipidfasen, og gir en diameter på ≤ 200 nm.

(E) Et bredt spektrum av forbindelser kan innkapsles ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Egnede forbindelser omfatter uten begrensning, fluorescerende molekyler, radiokontrastmidler, radioaktive isotoper og forbindelser, paramagnetiske forbindelser, spinmerkelapper, flavinholdige forbindelser, antibiotika såsom aminoglykosider, antivirale forbindelser såsom azidotymidin eller deoksytytidin og deres fosforylerte derivater, nukleotider og deres fosforylerte derivater, karbohydrater, peptider såsom vasopressin, oksytocin, luteiniserende hormonfrigjørende hormon, muramylpeptidderivater og analoger, kalcitonin, insulin, proteaseinhibitorer såsom kaptopril og leupeptin, renininhibitorer, oligonukleotider og deres derivater (se f.eks. G. Zon, Pharmaceut. Res. (1988) 5:539-49), ribonukleinsyrer, deoksyribonukleinsyrer, modifiserte nukleinsyrer, proteiner såsom superoksyddismutase, humant veksthormon, interferoner, interleukiner såsom IL-1, IL-2, og lignende. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen danner fordelaktig liposomer eller lipidpartikler under lav skjærkraftbetingelser, og danner partikler med en veldefinert størrelse og høy konsentrasjon.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av en lipidoppslemming av definert partikkelstørrelse for innkapsling av en nyttig forbindelse,

k a r a k t e r i s e r t v e d :

å løse nevnte nyttige forbindelse og en innkapslingsmengde av et egnet lipid i en tilstrekkelig mengde av en løsningsmiddelblanding omfattende et ikke-halogenert aprotisk løsningsmiddel for å tilveiebringe en forbindelse/lipidløsning; og

å presse nevnte forbindelse/lipidløsning gjennom en åpning av passende størrelse inn i en vandig løsning for å danne en lipid-forbindelseoppslemming med definert partikkelstørrelse.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det som nevnte nyttige forbindelse anvendes en som har dårlig løselighet i vann, alkoholer og halogenerte hydrokarbonløsningsmidler.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det som nevnte lipidoppslemming med definert partikkelstørrelse anvendes en oppslemming av liposomer.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det som nevnte nyttige forbindelse anvendes en som velges fra gruppen omfattende amfotericin B, nystatin og primaricin, og nevnte lipid og nevnte dårlig løselige forbindelse er tilstede i et forhold på ca. 1:1 til 1:5.

5. Fremgangsmåte for fremstilling av en lipidoppslemming med definert partikkelstørrelse for innkapsling av en nyttig vannløselig forbindelse,

k a r a k t e r i s e r t v e d :

å løse en innkapslingsmengde av et egnet lipid i en tilstrekkelig mengde av en løsningsmiddelblanding omfattende et ikke-halogenert aprotisk løsningsmiddel som gir en lipidløsning; og

å presse nevnte lipidløsning gjennom en åpning av egnet størrelse inn i en vandig løsning av nevnte nyttige forbindelse slik at det dannes en lipid-forbindelseoppslemming med definert partikkelstørrelse.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 5,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det som nevnte nyttige forbindelse anvendes en som velges fra gruppen omfattende svake syrer, svake baser, chelateringsmidler, aminosyrer, fluorescerende molekyler, radiokontrastmidler, radioaktive isotoper og forbindelser, paramagnetiske forbindelser, spinnmarkører, løselige antibiotika, antiviruserforbindelser, nukleotider og deres fosforylerte derivater, karbohydrater, peptider, oksytocin, luteiniserende hormonfrigjørende hormon, muramylpeptid-derivater og analoger, kalcitonin, insulin, proteaseinhibitorer, renin-inhibitorer, oligonukleotider og deres derivater, ribonukleinsyrer, deoksyribonukleinsyrer, modifiserte nukleinsyrer, superoksyddismutase, humant veksthormon, interferoner, kolonistimulerende faktorer, nervevekstfaktor, transformerende vekstfaktor alfa og beta, epidermal vekstfaktor, IL-1 og IL-2.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 1 og 5,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det som nevnte lipidoppslemming med definert partikkelstørrelse anvendes en oppslemming av liposomer.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det som nevnte aprotiske løsningsmiddel anvendes et som velges fra gruppen omfattende dimetylsulfoksyd, dioksan, dimetylformamid, acetonitril, dimetylacetamid, sulfolan, gamma-butyrolakton,

1-metyl-2-pyrrolidinon og metylpyrolin.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det i nevnte løsnings-
middelblanding anvendes en lipidsolubiliserende mengde av en
lavere alkanol.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 1 og 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det som nevnte lipid
anvendes et som velges fra gruppen omfattende egg-fosfatidyl-
cholin, egg-fosfatidylglycerol, dipalmitoylfosfatidylcholin,
kolesterol, kolesterolsulfat og salter derav, kolesterolhemi-
sukcinat og salter derav, kolsterolftalat og salter derav,
kolesterolfosfat og salater derav, kolesterylfosforylcholin,
3,6,9-tri-oksaoktan-1-ol-kolesteryl-3e-ol, dimyristoyl-
fosfatidylglycerol, dimyristoylfosfatidylcholin og hydrogenert
soyafostfatidylcholin.

FIG. 1

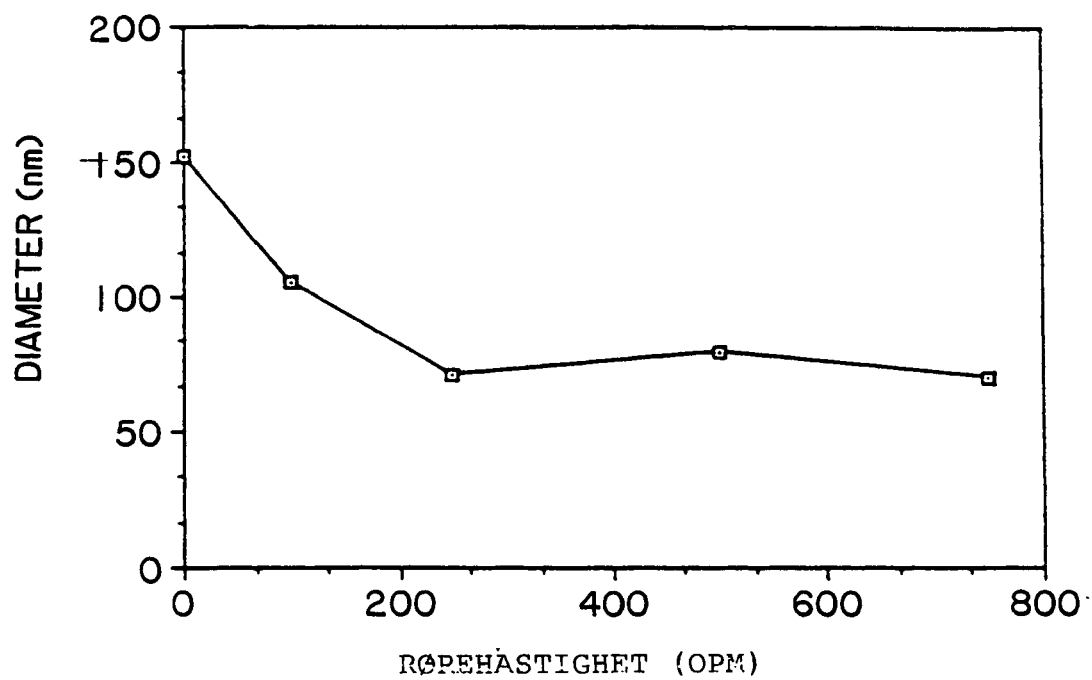


FIG. 2

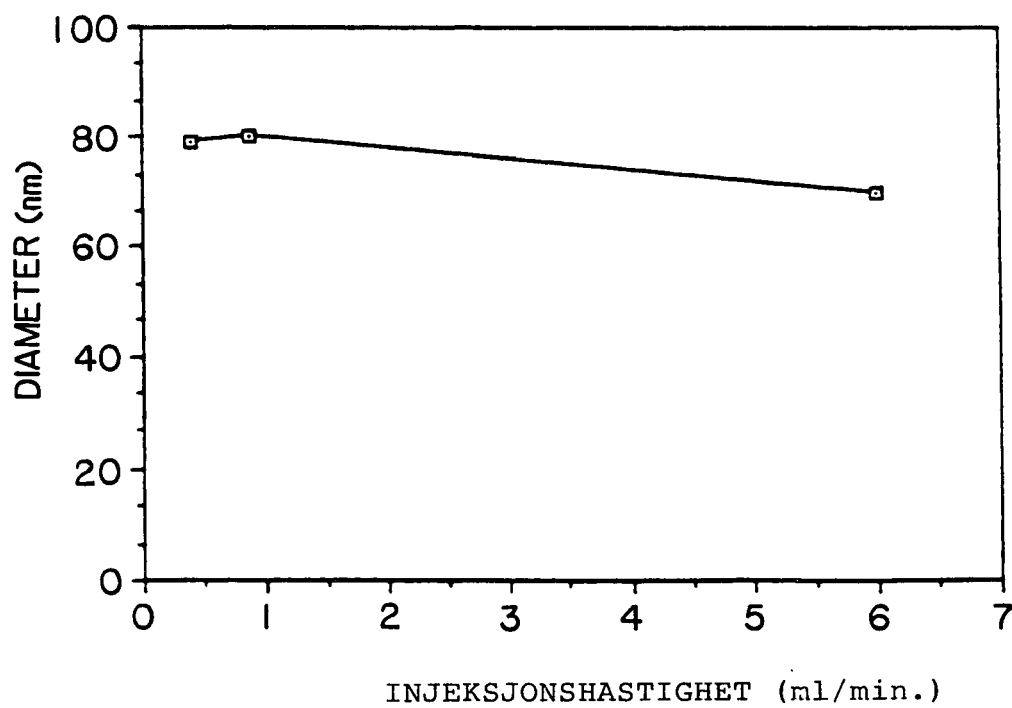


FIG. 3

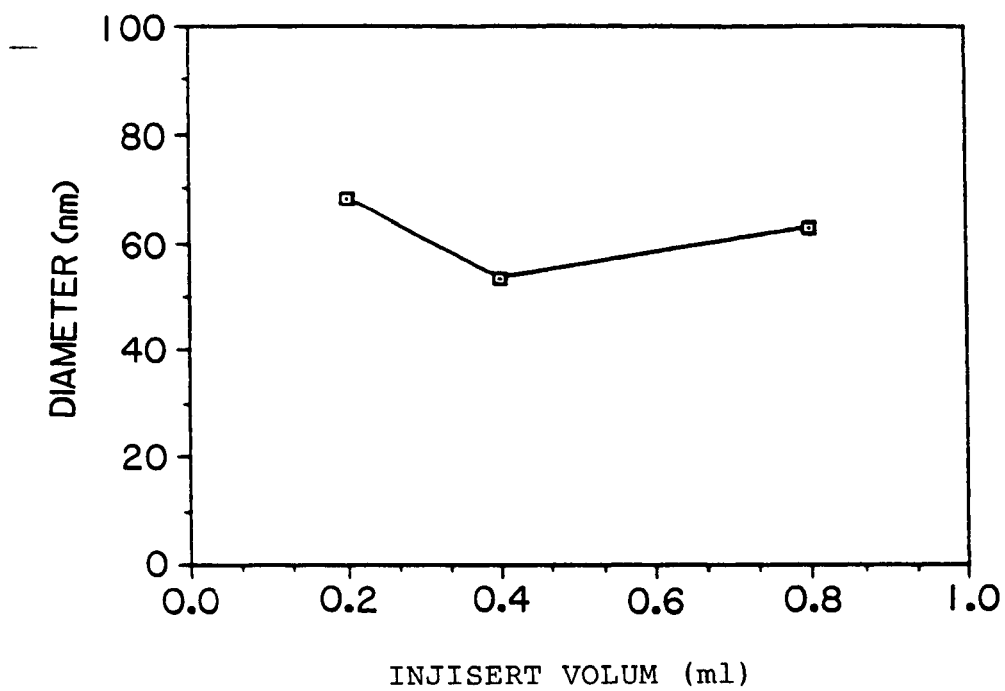


FIG. 4

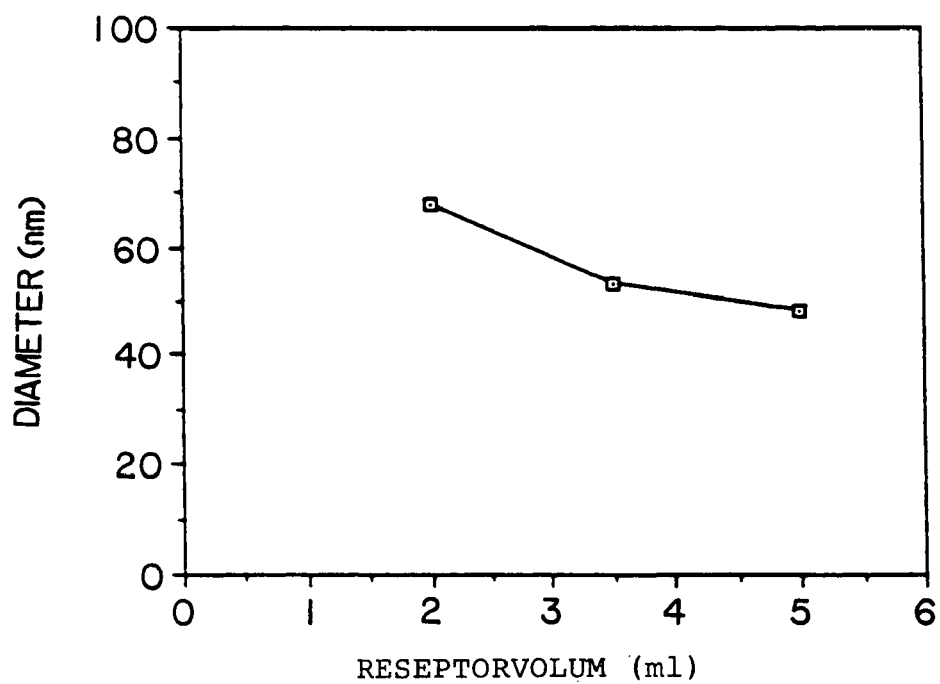


FIG. 5

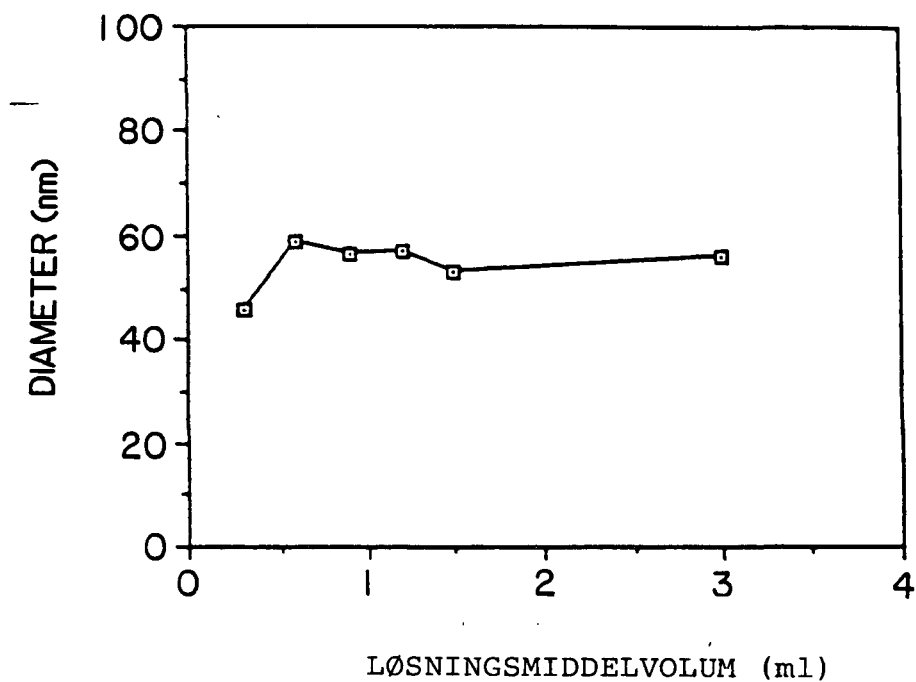


FIG. 6

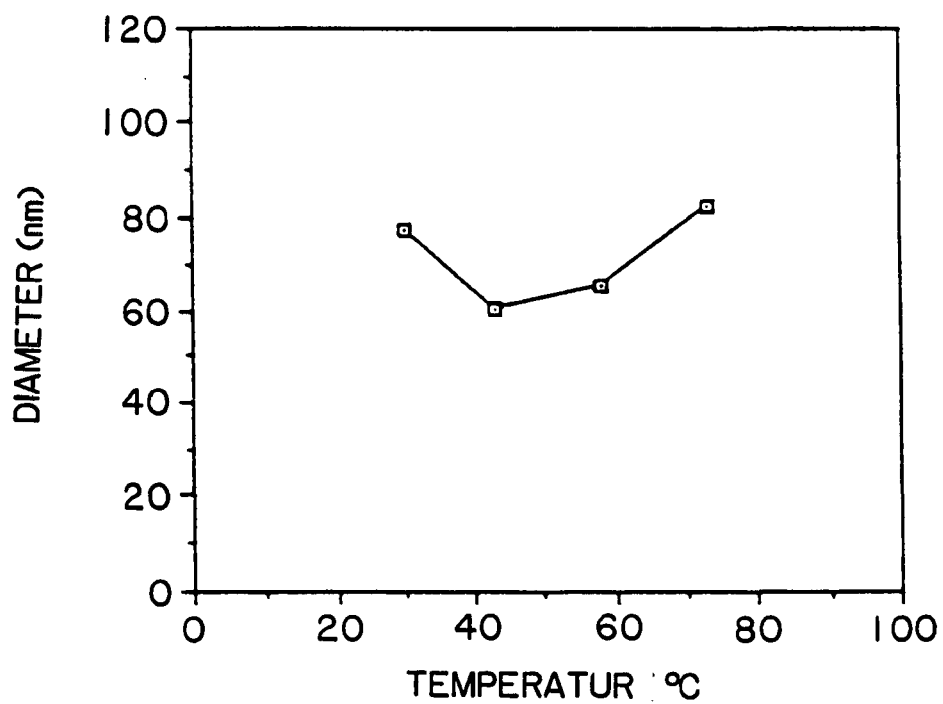


FIG. 7

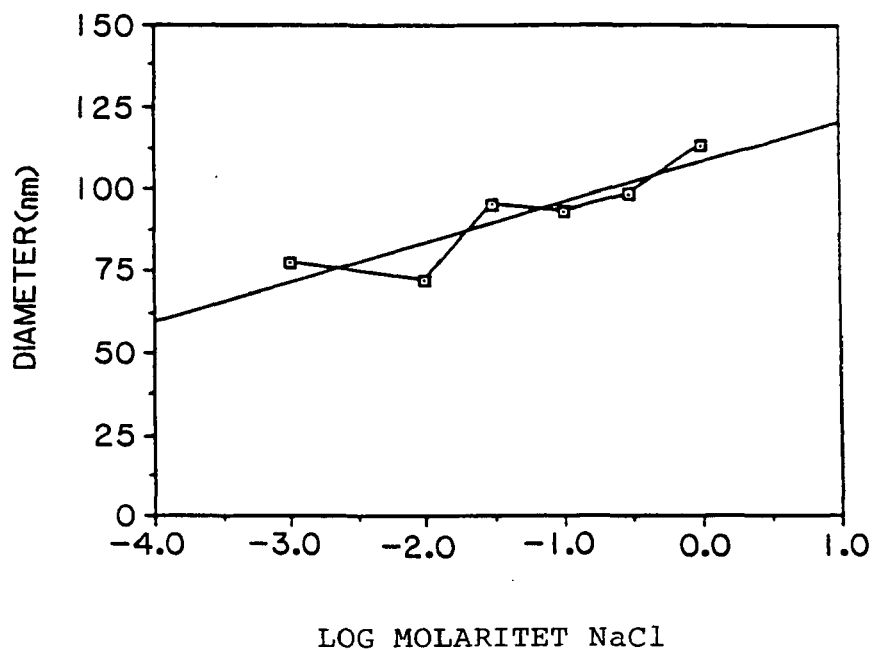


FIG. 8

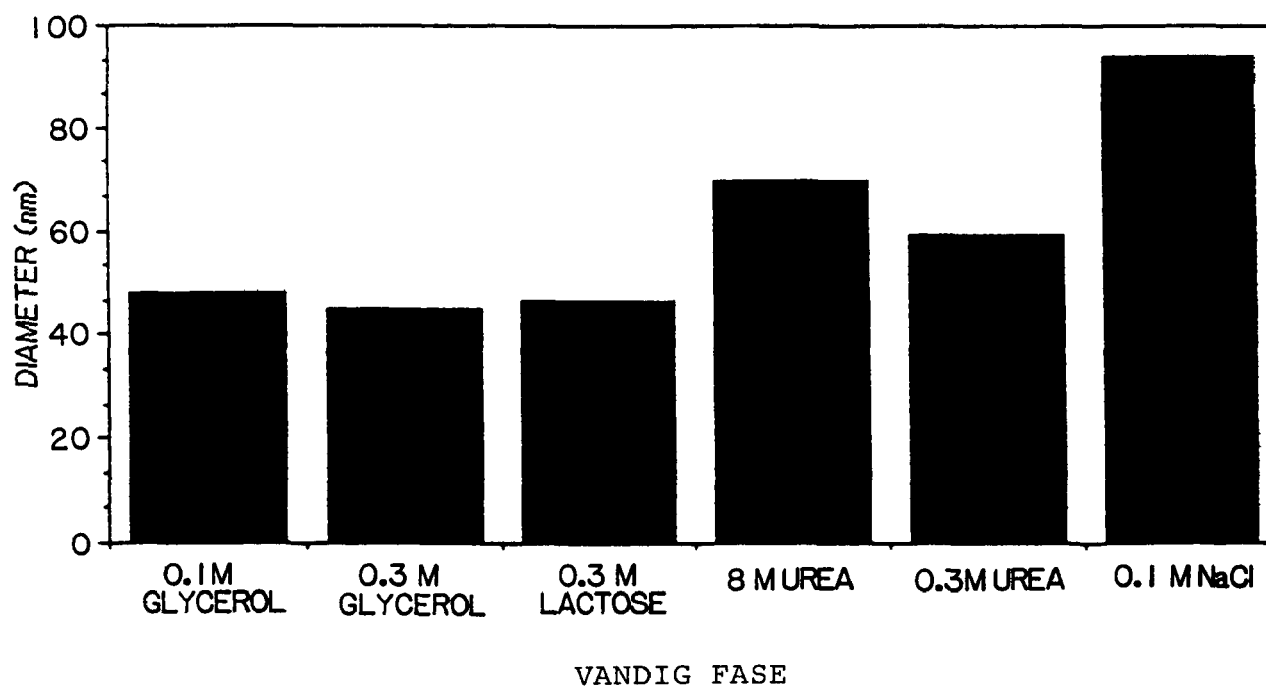


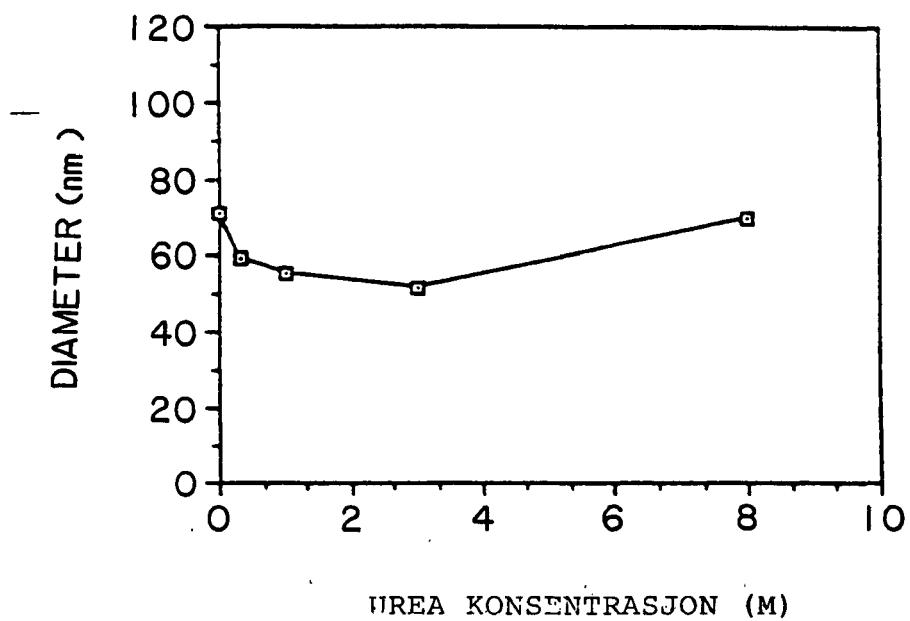
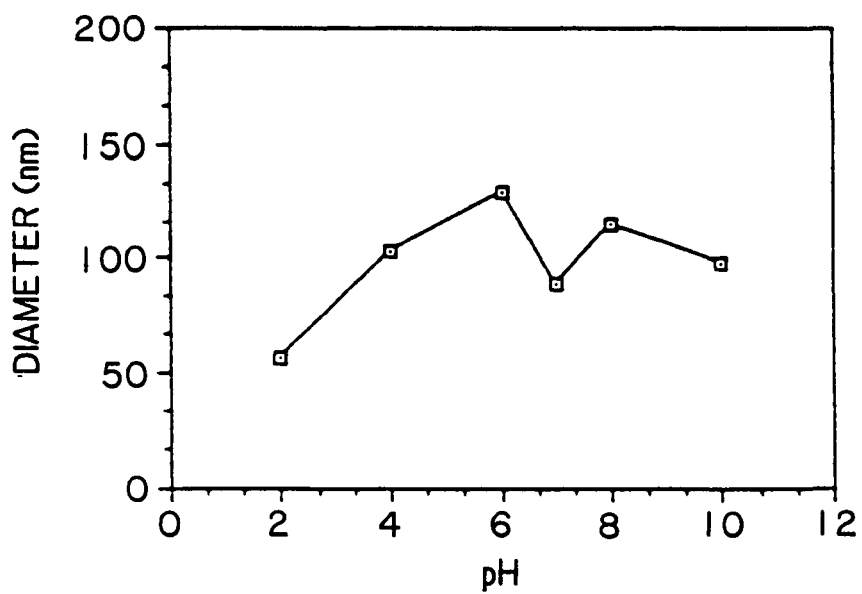
FIG. 9**FIG. 10**

FIG. 11

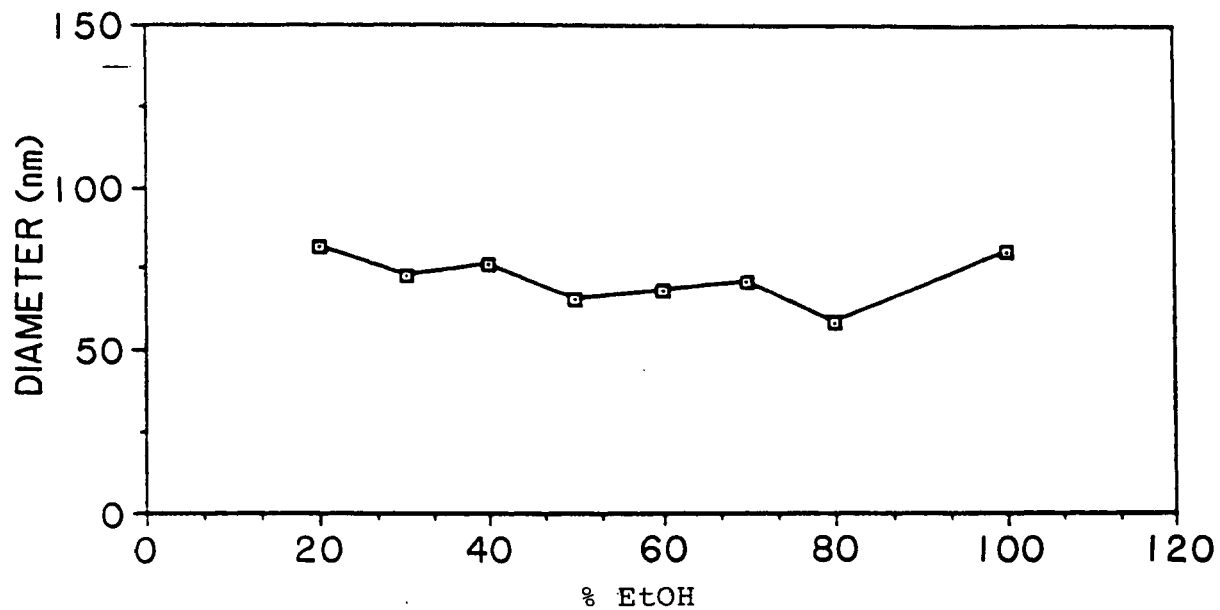


FIG. 12

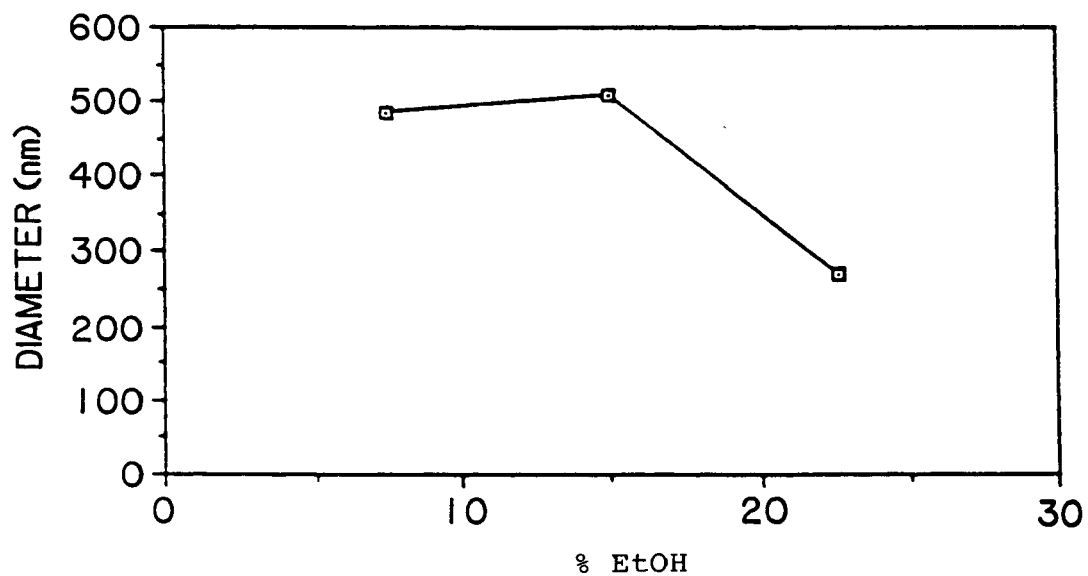


FIG. 13

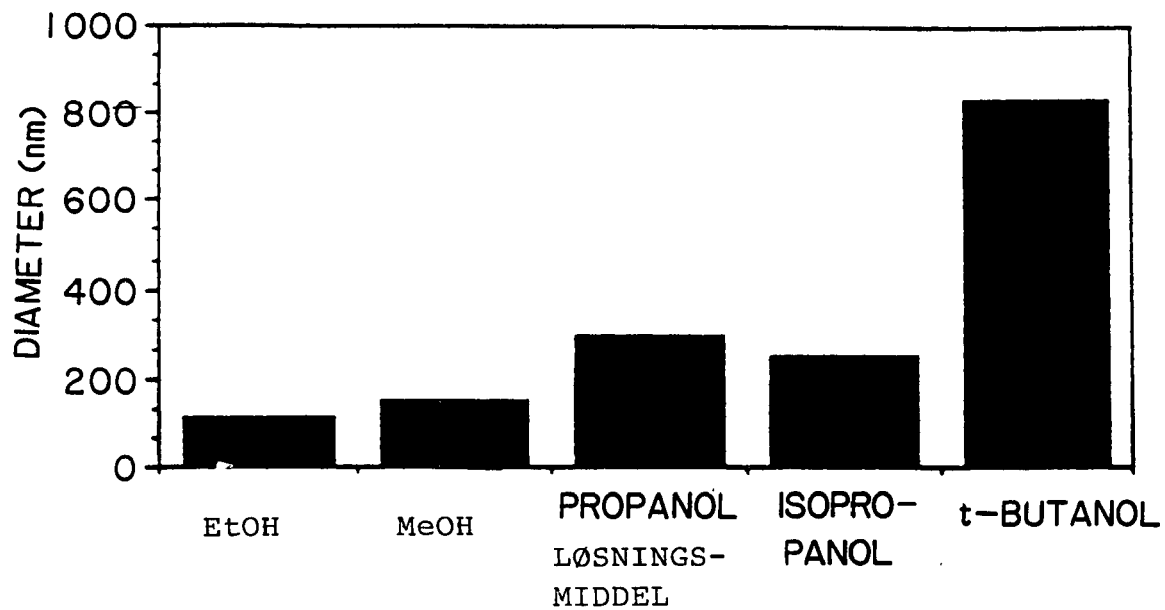


FIG. 14

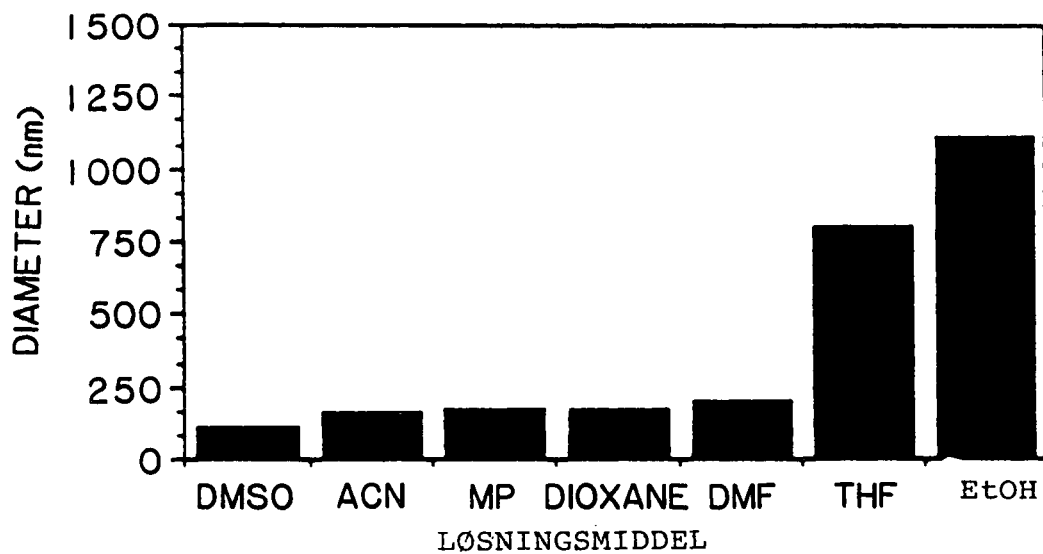


FIG. 15

