(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 31 041 T2** 2004.03.04

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 731 690 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 31 041.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB95/00802**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 930 698.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/010393**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.09.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **11.04.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.09.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **11.06.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.03.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 9/127**

(30) Unionspriorität:
9481057 30.09.1994 AT

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Bracco Research S.A., Plan-les-Quates, CH

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(72) Erfinder:
TOURNIER, Herve, F-74520 Valleiry, FR;
SCHNEIDER, Michel, CH-1256 Troinex, CH;
GUILLOT, Christian, F-74160 Le Châble-Beaumont, FR

(54) Bezeichnung: **LIPOSOMEN MIT ERHÖHTEM EINSCHLUSSVERMÖGEN, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung betrifft einen Liposomvesikelvorläufer in Form einer trockenen Lipidabscheidung und ein Verfahren zur Herstellung von Liposomvesikeln mit verbesserter Einschlusskapazität, bei dem man ein oder mehrere filmbildende Lipide in mindestens einem organischen Lösungsmittel in einem Reaktionsgefäß löst, man die Lipide durch Verdampfen des Lösungsmittels abscheidet, man die Lipidabscheidung mit einer wässrigen Lösung als Trägerphase in Kontakt bringt und Liposomvesikel produziert die die Lösung einschließen.

Technischer Hintergrund

[0002] Liposomenvesikel, deren Bindungshülle aus einer Bi- oder Multischicht von Lipidmolekülen besteht, sind seit langem als Wirkstoffabgabesysteme bekannt, die die therapeutische und diagnostische Wirksamkeit vieler Wirkstoffe und Kontrastmittel erhöhen können. Experimente mit einer Reihe unterschiedlicher Antibiotika und Röntgenkontrastmittel haben gezeigt, dass eine bessere therapeutische Aktivität oder ein besserer Kontrast mit einer höheren Sicherheitsspanne erreicht werden können, indem Wirkstoffe und Kontrastmittel mit Liposomen verkapselt werden. Großes Interesse an Liposomen als Verkapselungssysteme für Wirkstoffe hat gezeigt, dass die erfolgreiche Entwicklung und Kommerzialisierung solcher Produkte reproduzierbare Verfahren zur Produktion von Lipidvesikeln im Großmaßstab mit geeigneten Charakteristika erfordert. Demzufolge wurde eine Suche nach Verfahren gestartet, die unabhängig von der Beschaffenheit der Lipidmischung konsistent Liposomvesikel der erforderlichen Größe und Konzentration, Größenverteilung und Einschlusskapazität produzieren. Solche Verfahren sollten Liposome mit konsistentem Verhältnis von aktiver Substanz zu Lipid liefern, während derzeit anerkannte gute Fertigungspraktiken (good manufacturing practices) beachtet werden. Als Ergebnis der Suche und aufgrund der Tatsache, dass das Liposomverhalten in Abhängigkeit von verschiedenen Produktionsparametern deutlich variieren kann, sind bislang viele verschiedene Fertigungsverfahren vorgeschlagen worden.

[0003] Konventionelle Liposomherstellungsverfahren schlossen eine Anzahl von Schritten ein, in denen die Multi- oder Bischicht bildenden Komponenten (Phospholipide oder Mischungen von Phospholipiden mit anderen Lipiden, z. B. Cholesterin) in einem flüchtigen organischen Lösungsmittel oder einer flüchtigen organischen Lösungsmittelmischung in einem Rundkolben aufgelöst wurden und anschließend das Lösungsmittel unter Bedingungen (Temperatur und Druck) verdampft wurde, die die Phasentrennung-verhindern. Nach der Lösungsmittelentfernung wurde eine trockene Lipidmischung, üblicherweise in Form einer Filmabscheidung auf den wänden des Reaktors, mit einem wässrigen Medium hydratisiert, das gelöste Puffer, Salze, Konditioniermittel und eine aktive Substanz enthalten kann, die eingeschlossen werden soll. Liposome bilden sich in dem Hydratisierungsschritt, wobei ein Teil des wässrigen Mediums in den Liposomen verkapselt wird. Die Hydratisierung kann mit oder ohne Energiezufuhr zu der Lösung mittels Rühren, Schallbehandlung oder Mikrofluidifizierung mit nachfolgender Extrusion durch einen oder mehrere Polycarbonatfilter durchgeführt werden. Die freie, nicht-verkapselte, aktive Substanz kann zur Gewinnung abgetrennt werden, und das Produkt wird filtriert, sterilisiert, gegebenenfalls lyophilisiert und verpackt.

[0004] Die Hydratisierung beeinflusst mehr als jeder andere Schritt den Typ der gebildeten Liposomen (Größe, Anzahl der Lipidschichten, eingeschlossenes Volumen). Die Beschaffenheit des getrockneten Lipids, seine Oberfläche und seine Porosität sind von besonderer Bedeutung. Es ist somit erkannt worden, dass das Hydratisierungs- und Einschlussverfahren am effizientesten sind, wenn der Film aus trockenen Lipiden dünn gehalten wird. Dies bedeutet, dass eine um so größere Oberfläche zur Abscheidung der Lipide erforderlich ist, je größer die Lipidmenge ist, es bedeutet auch, dass das Dünnfilmverfahren im Wesentlichen ein Laborverfahren bleibt, selbst wenn Glasperlen und andere inerte unlösliche Teilchen verwendet werden, um die zur Filmabscheidung verfügbare Oberfläche zu erhöhen.

[0005] Andere Verfahren zur Liposomenherstellung, die die Injektion von organischen Lösungen von Lipiden in ein wässriges Medium mit kontinuierlicher Entfernung von Lösungsmittel, Verwendung von Sprühtrocknen, Lyophilisierung, Mikroemulsionsbildung und Mikrofluidifizierung, usw. beinhalten, sind in einer Reihe von Veröffentlichungen oder Patenten vorgeschlagen worden, wie beispielsweise US-A-4 529 561, US-A-4 572 425 und EP-A-186 352.

[0006] Ein Versuch, Probleme der Maßstabvergrößerung der Liposomproduktion zu lösen, ist in US-A-4 935 171 (Vestar) beschrieben worden. Es wird ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen in kommerziellen Mengen durch Bilden eines homogenen und gleichförmigen Lipidfilms in einem Dünnfilmverdampfer durch Verdampfen des organischen Lösungsmittels offenbart. Nach dem Trocknen des dünnen Lipidfilms, der auf der Innenwand des Verdampfers gebildet wird, wird die Abscheidung in situ mit einer wässrigen Phase unter Bewegung hydratisiert, die der Rotor liefert. Obwohl die in diesem Dokument vorgeschlagene Lösung ein Schritt in die richtige Richtung zu sein scheint, ist das Verhältnis von Lipidfilmoberfläche zu dem Reaktorvolumen nur

etwas, wenn nicht marginal besser als das der Rundkolben, die im Labormaßstab verwendet werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute oder Produktivität des Reaktors sind noch viel zu niedrig für wirtschaftliche Lauffähigkeit und Wettbewerbsfähigkeit des Verfahrens.

[0007] Verschiedene Aspekte der Liposomherstellung sind angesprochen worden, und eine Reihe von Verbesserungen und unterschied- liche Lösungen für das Problem der Maßstabvergrößerung sind vorgeschlagen worden. Dokumente wie beispielsweise WO-A-86/00238, WO-A-87/00043, US-A-4 737 323, US-A-4 753 788 und US-A-4 781 871 haben die Verwendung von Schnellgefrieren der zuvor hergestellten multilamellaren Vesikel mit nachfolgender Gefrier- und Auftaubehandlung, um ihre Einschlusskapazität zu verbessern, und die Verwendung von Extrusionstechnik vorgeschlagen, um ihre Größenverteilung zu verbessern, usw.

[0008] Bislang gab es keinen Vorschlag in Richtung eines industriellen Verfahren im Großmaßstab, dessen Steuerung der Produktionsparameter ein reproduzierbares Verfahren ermöglicht, in dem große Flüssigkeitsvolumina innerhalb eines relativ kleinen Reaktorraums verarbeitet werden. Alle bekannten Verfahren im Pilotoder Industriemaßstab sind in der Regel mit kleinen Chargen verbunden, in denen die Verarbeitung großer Volumina verdünnter Liposomlösungen viel Bodenfläche und Reaktorraum sowie die Handhabung großer Volumina an Lösungen und Lösungsmitteln benötigen würde. In der Realität sind diese Verfahren infolge relativ niedriger Raum-Zeit-Ausbeuten oder Produktivität der Reaktoren zu mühselig und viel zu kostspielig für eine kommerzielle Produktion im Großmaßstab.

Kurzfassung der Erfindung

[0009] Kurz gesagt betrifft die Erfindung einen trägergestützten oder trägerlosen Liposomvesikelvorläufer in Form einer dreidimensional aufgeschäumten Lipidstruktur mit einer Schüttdichte unter 0,1 g/cm^3, vorzugsweise unter 0,08 g/cm^3, insbesondere zwischen 0, 05 und 0, 001 g/cm^3, besonders bevorzugt zwischen 0, 02 und 0, 01. Mit trägergestützter Struktur ist gemeint, dass die poröse Lipidabscheidung auf einer Anordnung oder einem Netzwerk aus inertem Trägermaterial gebildet wird. Die die Abscheidung bildenden Lipide sind ausgewählt aus synthetischen oder natürlichen, gesättigten und ungesättigten Phospholipiden einschließlich Phosphatidsäure, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol und Mischungen davon. Die Lipide können ferner Substanzen ausgewählt aus Dicetylphosphat, Cholesterin, Ergosterin, Phytosterin, Sitosterin, Lanosterin, α-Tocopherol, Stearinsäure, Stearylamin und Mischungen davon enthalten.

[0010] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von Liposomenvesikeln mit verbesserter Einschlußkapazität gemäß Anspruch 11. Die Lösung der Lipide wird in ein geeignetes Reaktionsgefäß eingebracht und eingedampft, wodurch die trocknenden Lipide eine aufgeschäumte dreidimensionale poröse Struktur bilden, deren Schüttdichte unter 0,1 g/cm^3, vorzugsweise unter 0,08 g/cm^3, insbesondere zwischen 0,05 und 0,001 g/cm^3 und besonders bevorzugt zwischen 0,02 und 0,01 g/cm^3 liegt. Nachfolgend wird die poröse Struktur mit einer wässrigen Trägerphase kontaktiert, um Liposomvesikel zu produzieren, die einen Teil der Trägerphase einschließen.

[0011] Das Röhrenmaterial ist vorzugsweise Röhrenmaterial aus rostfreiem Stahl mit einem Innendurchmesser zwischen 0,5 mm und 5 mm und der Wanddicke zwischen 0,5 mm und 2 mm. Alternativ kann die Packung, die stationär oder bewegt, z. B. fluidifiziert, sein kann, Raschig-Ringe, hohle Glaskugeln, netzartigen Kohlenstoff, netzartigen glasartigen Kohlenstoff, netzartiges Metall, Glasoder Metallwolle und Glas- oder Metallfasern enthalten.

[0012] Die erfindungsgemäßen dreidimensionalen Lipidstrukturensind sehr geeignet für die Herstellung von Liposomen mit hoher Einschlusskapazität im Großmaßstab.

[0013] Beim Inkubieren mit einer wässrigen Trägerphase, die ein Kontrastmedium enthält, sind die erfindungsgemäßen dreidimensionalen Lipidstrukturen besonders geeignet zur Herstellung diagnostischer Kontrastmittel.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0014] **Fig.** 1 ist ein Schemadiagramm des Reaktors mit einem Ausschnitt, der die aufgeschäumte dreidimensionale Lipidstruktur der Erfindung zeigt.

[0015] **Fig.** 2 ist ein Schemadiagramm des Reaktors mit einer Anordnung aus inertem Röhrenmaterial.

[0016] **Fig.** 3 ist eine Auftragung von Lipdabscheidung gegen Konzentration.

[0017] **Fig.** 4 ist eine Auftragung von Lipidabscheidung gegen lineare Geschwindigkeit.

[0018] **Fig.** 5 ist ein Fließdiagramm der Herstellung eines Kontrastmediums unter Verwendung der erfindungsgemäßen aufgeschäumten Lipidstrukturen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0019] Diese Erfindung basiert auf dem unerwarteten Fund, dass optimale Liposombildung und erhöhte Reaktorkapazität erhalten werden, wenn während der Produktion der Vesikel die Lipidabscheidung, die durch Verdampfen des Lösungsmittels aus einer organischen Lösung von einer oder mehreren filmbildenden Lipiden in mindestens einem organischen Lösungsmittel erhalten wird, vor dem Kontaktieren mit einer wässrigen Trägerphase zu einer dreidimensionalen Struktur aufgeschäumt wird, deren Schüttdichte unter 0,1 g/cm^3, vorzugsweise unter 0,08 g/cm^3, insbesondere zwischen 0,05 und 0,001 g/cm^3 und besonders bevorzugt zwischen 0,02 und 0,01 g/cm^3 liegt. Obwohl die genauen Gründe für diese unerwarteten Ergebnisse nicht genau bekannt sind, wird angenommen, dass das Verfahren ein auflergewöhnliches Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der Abscheidung liefert, deren nachfolgende Hydratisierung daher effizienter verläuft. Hohe Ausbeuten von Liposomen der gewünschten Größe und Verteilung werden somit nach dem Verfahren hergestellt, das sich besonders leicht im Maßstab vergrößern und steuern lässt. Mit einem großen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen verbessern die aufgeschäumten Lipidstrukturen die Raum-Zeit-Ausbeute von Reaktoren, wodurch die Technik industriell sehr attraktiv wird. Zudem liefert das Verfahren zur Erleichterung der Maflstabvergrößerung und Förderung von hoher Produktivität weitere Vorteile, zu denen raschere Reaktorumschlagzeit, leichte Steuerung des Hydratisierungsschritts, verringerte Verarbeitungszeiten, Verwendung preisgünstiger Materialien und schließlich Verwendung desselben Reaktors zur Abscheidung, Lösungsmittelverdampfung, Hydratisierung der aufgeschäumten Lipidstruktur und Sterilisation der gebildeten Liposomvesikel gehören.

[0020] Es ist gefunden worden, dass die porösen Strukturen von reinen erfindungsgemäßen Lipiden ein sehr großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen haben. Leider konnte aufgrund der großen Fragilität der aufgeschäumten Struktur die genaue Oberfläche pro Volumen- oder Gewichtseinheit der aufgeschäumten Lipidstruktur nicht mit großer Genauigkeit ermittelt werden. Eine konservative Schätzung der Gesamtoberfläche von 1 g der erfindungsgemäßen auf– geschäumten Struktur legt jedoch nahe, dass die Gesamtoberfläche zwischen 0,1 und 50 m^2 variieren kann, was zu Verhältnissen von Oberfläche zu Volumen zwischen 10 und 0,5 × 10^5 führt.

[0021] Die aufgeschäumte dreidimensionale Lipidstruktur kann durch Verdampfen des organischen Lösungsmittels aus einem Reaktionsgefäß erhalten werden, das ein inertes poröses Netzwerk oder einen Träger enthält, der als materieller Träger oder Matrix für die Abscheidung der Lipide dient. Das inerte Netzwerk kann jedes zweckmäßige Material mit einem relativ großen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen sein und kann eine Anordnung von Röhrenmaterial oder eine Anordnung von inerter Packung einschließen, wie hohle Glaskugeln, netzartiger Kohlenstoff, netzartiger, glasartiger Kohlenstoff, netzartiges Metall, Glas- oder Metallwolle und Glas- oder Metallfaser. Wenn eine Anordnung von Röhrenmaterial verwendet wird, sollten die Röhrenmaterialabmessungen so gewählt werden, dass ein maximales Verhältnis von Oberfläche zu Volumen erreicht wird. Die im Verlauf der Entwicklung und Charakterisierung des erfindungsgemäßen Reaktors durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass in einer gegebenen Konfiguration die Röhrenmaterialien mit einem Innendurchmesser zwischen 0,5 mm und 5 mm und Wanddicken zwischen 0, 5 und 2 mm günstige Ergebnisse liefern, eine andere Reaktorkonfiguration kann jedoch andere Röhrenmaterialdimensionen begünstigen. Es ist gefunden worden, dass eine Anordnung vertikal positionierter Röhrenmaterialien bevorzugt ist, da die Lipidlösung infolge der Schwerkraft über die innere und äußere Oberfläche des Röhrenmaterials verteilt wird, obwohl auch eine Helixanordnung möglich ist.

[0022] Um die gleichförmige Abscheidung der Lipidfilme zu erleichtern, kann die inerte Packung gelinde fluidifiziert werden, oder die Lipidlösung kann von oben und links in den mit Raschig-Ringen oder irgend einem anderen Inertmaterial, wie oben erwähnt, gepackten Reaktor eingespeist werden, so dass sie sanft an der Pakung herunterrieselt. Es wird angenommen, das die in der Rieselturmanordnung erhaltenen hervorragenden Ergebnisse aus der Tatsache resultieren, dass eine effiziente Steuerung der Abscheidungsdicke durch die Rieselkontaktweise der Lipidlösung und des Trägers erreicht wird. Die überschüssige Flüssigkeit wird konstant entfernt, wodurch eine gleichförmige Flüssigkeitsdicke auf der gesamten Oberfläche des Trägers gewährleistet ist. Um die gleichförmige Bildung der Beschichtung aus der Lipidlösung auf der Pakung weiter zu unterstützen, kann Luft oder ein Inertgas, wie Stickstoff, im Gegenstrom für eine Zeitspanne eingebracht werden. Das Gas ist üblicherweise kalt, es kann unter bestimmten Bedingungen jedoch erwünscht sein, dass die Temperatur des Gases so gewählt wird, dass das Trocknen und Aufschäumen des Lipidfilms unter Verwendung von heißem Gas unterstützt oder durchgeführt wird.

[0023] Nach Trocknen und Aufschäumen der Abscheidung, die aus reinen Lipiden oder Lipiden mit dem üblichen Reinheitsgrad besteht, zu der dreidimensionalen Struktur wird die Abscheidung mit einer wässrigen Trägerphase kontaktiert. In Abhängigkeit von der Konfiguration des Reaktors kann die Trägerphase im unteren Ende des Reaktors, z. B. im Fall der Rieselturm- oder fluidifizierten Bettenkonfiguration, oder im oberen Bereich der Reaktorsäule (im Fall der fixierten Anordnung von Röhrenmaterialien) eingebracht werden. Die verwendete wässrige Trägerphase kann rein sein, oder kann biologisch aktive Substanzen, Kontrastmittel oder beides enthalten. Praktisch jede biologisch aktive Substanz kann in die erfindungsgemäß hergestellten Lipo-

somen eingeschlossen werden. Zu solchen Substanzen gehören antibakterielle Verbindungen, wie Gentamycin, antivirale Verbindungen, wie Rifamycine, fungizide Verbindungen, wie Amphotericin B, antiparasitische Verbindungen, wie Antimonderivate, antineoplastische Verbindungen, wie Mitomycin C, Doxorubicin und Cisplatin, Proteine, wie Albumin und Lipoproteine, Immunglobuline, Toxine, wie Diphterietoxin, Enzyme, wie Katalase, Hormone, Neurotransmitter, radioopake Verbindungen, wie ^{99}Tc, fluoreszierende Verbindungen, wie Carboxyfluoreszein, entzündungshemmende Verbindungen, wie Salicylsäure und Ibuprofen, Anaesthetika, wie Dibucain oder Lidocain, usw., sie sind jedoch nicht hierauf begrenzt.

[0024] Sehr gute Ergebnisse und hohe Einschlussbeladungen werden mit iodierten Röntgenkontrastmittel erreicht, wie Iopamidol, Iomeprol, Iohexol, Iopentol, Iotrolan, Iodixanol, Ioglukol, usw. Das Verhältnis von Iod zu Lipid beträgt bei den erf indungsgemäßen Liposomvesikeln mindestens 2,75.

[0025] Das Verdampfen des organischen Lösungsmittels oder der Mischung von Lösungsmitteln wird oberhalb von Umgebungstemperatur oder unter vermindertem Druck oder beidem durchgeführt. Experimente haben gezeigt, dass die Verdampfungsrate einen starken Einfluss auf den Aufschäumungsgrad der Lipidstruktur hat. Für eine optimale Aufschäumung muss man daher die Wärmemenge und den Druck in dem Reaktor geeignet steuern. Die Steuerung wird gegen Ende der Lösungsmittelverdampfung besonders wichtig, d. h. wenn die Lösung sich verdickt und viskos wird. An diesem Punkt führt eine leichte Druckverringerung zu einem vergleichsweise raschen Aufschäumen (Schaumbildung). Es ist gefunden worden, dass durch Abgleichen von Temperatur und Druck für ein gegebenes Lösungsmittel oder eine gegebene Lösungsmittelmischung unterschiedliche Aufschäumungsgrade der Lipidabscheidung erreicht werden können. Die besten Ergebnisse werden erhalten, wenn das organische Lösungsmittel ausgewählt ist aus Petrolether, Chloroform, Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, n-Butanol, tert.-Butanol, Pentanol, Hexanol, Pantan, Hexan, Heptan, Cyclohexan und Mischungen davon. Das Lösungsmittel ist vorzugsweise eine azeotrope Mischung zweier Lösungsmittel. Gute Ergebnisse sind mit azeotropen Mischungen von Ethanol mit Cyclohexan, Chloroform mit Methanol und Isopropanol mit Hexan erhalten worden.

[0026] Zur Herstellung von Liposomvesikeln verwendete Lipide sind konventionell und sind ausgewählt aus synthetischen oder natürlichen, gesättigten und/oder ungesättigten Phospholipiden einschließlich Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol, Phosphatidsäure. Die folgenden Phospholipide sind besonders brauchbar: Dipalmitoylphosphatidylcholin, Dipalmitoylphosphatidylglycerin, Dipalmitoylphosphatidylsäure, Dipalmitoylphosphatidylethanolamin und die entsprechenden Distearoyl- und Dimyristylanaloga und Mischungen davon. Die Lipide oder ihre Mischungen können ferner Substanzen ausgewählt aus Dicetylphosphat, Cholesterin, Ergosterin, Phytosterin, Sitosterin, Lanosterin, α-Tocopherol, Stearinsäure, Stearylamin und Mischungen davon enthalten.

[0027] Die Erfindung schließt auch eine trägergestützte oder trägerlose dreidimensionale Struktur aufgeschäumter Trockenlipide mit einer Dichte unter 0,1 g/cm^3, vorzugsweise unter 0,08 g/cm^3 und insbesondere mit einer Dichte zwischen 0,05 und 0,01 g/cm^3 ein. Mit trägergestützter Struktur ist gemeint, dass die poröse Lipidabscheidung auf einer Anordnung aus inertem Trägermaterial gebildet ist.

[0028] Die aufgeschäumten dreidimensionalen Lipidstrukturen sind sehr brauchbar zur Herstellung von Liposomen mit hoher Einschlusskapazität, insbesondere wenn diese Liposomen zum Tragen von Wirkstoffen oder diagnostischen Kontrastmitteln verwendet werden. In einem solchen Fall wird die poröse dreidimensionale Lipidstruktur mit einer wässrigen Lösung kontaktiert, die den Arzneistoff oder das diagnostische Mittel als aktiven Bestandteil enthält, wodurch sich Liposomen bilden und den Bestandteil verkapseln. Die die aktive Substanz tragenden Liposomen werden dann in konventioneller Weise so verarbeitet, wie es geeignet ist. Alternativ kann zuerst eine Suspension "leerer" Liposomvesikal gebildet werden, d. h. Liposomvesikel, die nur wässrigen flüssigen Träger enthalten. In dem nächsten Schritt werden diese "leeren" Liposomen mit einer Lösung kontaktiert, die einen aktiven Bestandteil enthält, und die Vesikeln werden unter Verwendung von beispielsweise Transmembranbeladungstechniken beladen.

[0029] Die Erfindung beinhaltet ferner eine Vorrichtung zur Herstellung von Liposomen mit hoher Einschlusskapazität, die ein Reaktionsgefäß mit einem Einlass und einem Auslass, eine Verbindung mit Vakuum, Mittel zum Kühlen oder Heizen, ein Steuermittel und eine Packung aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass die Packung eine Anordnung eng gepacktes Röhrenmaterial aus Inertmaterial ist. Das Röhrenmaterial mit dem Innendurchmesser zwischen 0,5 mm und 5 mm und der Wanddicke zwischen 0,5 und 2 mm wird vorzugsweise in vertikaler Weise angeordnet, obwohl auch eine spiralartige Anordnung möglich ist.

[0030] Die folgenden Beispiele illustrieren die Erfindung weiter:

Beispiel 1

Reaktorcharakterisierung

[0031] Eine vertikale, temperaturgeregelte, 1 m hohe Säule aus rostfreiem Stahl 316 L mit einem Innendurchmesser von 50 mm, die an ihrem unteren Ende mit einem Metallgitter ausgestattet ist, wurde mit 12 Röhren

aus rostfreiem Stahl gefüllt. Der Innendurchmesser des Röhrenmaterials war 4 mm, und die Wanddicke betrug 1 mm. Vor dem Einsetzen in den Reaktor wurde das Röhrenmaterial punktgeschweißt, um eine Anordnung paralleler Röhren zu bilden. Die gleiche Reaktorkonfiguration, jedoch mit Röhrenmaterial mit 2 mm und 3 mm Durchmesser, wurde auch hergestellt und getestet.

[0032] Vor den Tests, die das Aufschäumen der Lipidabscheidungen betrafen, wurde die Charakterisierung des Reaktors durch Abscheidung von nicht aufgeschäumten Lipidfilmen unter Verwendung der folgenden Lipidzusammensetzung durchgeführt: hydriertes Sojalecithin/Dicetylphosphat im Molverhältnis 9 : 1. Es wurden Experimente durchgeführt, um die besten Bedingungen für die Abscheidung der Lipide in den Röhren zu ermitteln und den Einfluss der Lipdkonzentration, des Innendurchmessers und der Beschaffenheit der Röhren und der Drainagerate der Lipidlösung herauszufinden. In allen Fällen wurden die Lipidlösungen in Chloroform bei Raumtemperatur in die Röhren eingebracht, und nach Füllen der Röhren von dem unteren Bereich wurden die Lipidlösungen mit gesteuerter Geschwindigkeit ablaufen gelassen. Die Abscheidung wurde bei 80°C unter Stickstoff durch Verdampfen des Lösungsmittels getrocknet, und die trockene Abscheidung wurde 3 Mal mit einer kleinen Menge Chloroform gespült.

Tabelle 1

Lipidkonzentration g/l	Lipidabscheidungen in mg Lipid/100 cm^2	
	3 mm Röhre	4 mm Röhre
180	33,1	23,3
220	43,7	29,7
260	62,5	40,0
300	81,5	56,5
320	94,5	80,4
340	111,3	84,2

[0033] Wie in Tabelle 1 und **Fig.** 3 gezeigt ist, nehmen die Mengen der Lipide zu, die bei verschiedenen Lipidkonzentrationen und zwei unterschiedlichen Durchmessern von Röhrenmaterial aus rostfreiem Stahl abgeschieden werden, die Lipidbeschichtung nimmt mit einem Anstieg der Lipidkonzentration zu. Außerdem werden in dem 3 mm Röhrenmaterial dickere Abscheidungen pro Flächeneinheit erhalten als bei 4 mm. In beiden Fällen schienen die Mengen der abgeschiedenen Lipide proportional zu dem Quadrat der Lipidkonzentration zu sein.

[0034] Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, nahm die Menge der abgeschiedenen Lipide mit der Drainagerate zu. Wenn diese Ergebnisse jedoch als Funktion der Drainagegeschwindigkeit (in cm pro Minute) anstatt der Drainagefließgeschwindigkeit (in ml pro Minute) ausgedrückt werden, scheinen die abgeschiedenen Mengen der Lipide nahezu proportional zu der Lineargeschwindigkeit zu sein, die unabhängig von der tatsächlichen Röhrengröße ist, siehe **Fig.** 4.

Tabelle 2

Drainagerate ml/Min	Lipidabscheidungen in mg Lipid/100 cm^2		
	2 mm	3 mm	4 mm
1	55,2	55,3	37,4
2	76,5	63,0	47,3
3,75	114,9	83,7	65,4
5	121,0	94,5	80,4

[0035] Weitere Experimente wurden in einem identischen Aufbau durchgeführt, wobei jedoch Glasröhren anstelle solcher aus rostfreiem Stahl verwendet wurden, wodurch gezeigt wird, dass es keine größeren Unterschiede zwischen den beiden Trägern in Bezug auf die Lipidabscheidung gibt. Die Homogenität der Lipidbeschichtung wurde ermittelt, indem die beschichteten Stahlröhren von oben in 10 cm Intervallen durchtrennt wurden und die Filmdicke gemessen wurde. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3

Fraktion	Lipidabscheidung in mg	
	3 mm Röhre	4 mm Röhre
1	5,15	5,13
2	6,63	3,77
3	7,22	4,52
4	8,20	3,50
5	7,59	5,58
6	6,55	6,16
7	5,59	6,38
8	5,63	6,21
9	5,22	6,97
10	9,06	6,86
Mittelwert ± Standardabweichung	6,68 ± 1,33	5,51 ± 1,24

[0036] Die Berechnung der Rohdichten (Schüttdichten) der Lipidabscheidungen, die in den drei unterschiedlichen Reaktorkonfigurationen erhalten wurden, haben gezeigt, dass für 2 mm Röhrenmaterial Schüttdichten zwischen 0, 04 und 0, 06 g/cm^3 lagen, für 3 mm Röhrenmaterial zwischen 0,02 und 0,04 g/cm^3 und für 4 mm Röhrenmaterial lagen die Schüttdichten zwischen 0,01 und 0,03 g/cm^3.

Liposomherstellung

[0037] Nach der Charakterisierung wurde ein neuer Reaktor mit 250 Röhren aus rostfreiem Stahl hergestellt und mit dem in **Fig.** 5 gezeigten Anordnung verbunden. 26 g hydriertes Sojaphosphatidylcholin (Nattermann) wurden mit 2 g Dicetylphosphat und 106 g Chloroform in einen 1 L Glasreaktor gegeben, der mit Rührer, Heizmantel und Kühler (**1**) ausgestattet war, und wurden unter Rühren bis zur vollständigen Auflösung auf 60°C erwärmt. Die Lipidlösung wurde mittels der peristaltischen Pumpe (**2**) durch den sterilen Filter (**3**) filtriert und in die Säule aus rostfreiem Stahl 316 L mit einem Heizmantel eingebracht, die mit 250 parallelen, 1 m langen Röhren (**4**) aus rostfreiem Stahl 304 gefüllt war. Der Überschuss der Lösung wurde entfernt, das Lösungsmittel verdampft und die Lipide bei 80°C abgeschieden, indem Luft von unten durch die Säule zirkuliert wurde.

[0038] Der 2 L Glasreaktor mit Rührer, Heizmantel, Kühler (**5**) wurde mit 849 g Iopamidol, 1196 g Wasser, 0,54 g EDTA und 1,60 g Tris gefüllt und unter Rühren auf 90°C erwärmt, bis vollständige Auflösung erhalten wurde. Dann wurde die Iopamidollösung filtriert, in den Glasreaktor (**6**) und daraus auf die Säule (**4**) überführt. Die Lösung wurde bei 75°C zwischen dem Reaktor (**6**) und der Säule (**4**) mittels der Zahnradpumpe (**7**) zirkuliert. Die gebildete Liposomsuspension wurde dann durch den Filter (**8**) extrudiert, in dem Reaktor (**9**) aufgefangen und dann unter Verwendung des Mikrofiltrationssystems (**10**) mittels Pumpe (**11**) konzentriert. Die konzentrierte Lösung wurde mit Salzlösung (**12**) gewaschen, um freies Iopamidol zu beseitigen (Diafiltration). Typische Verhältnisse von Iod zu Lipid (I/L) für eine Reihe von Experimenten, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden, lagen im Bereich von 2,5 bis 3,5 mit Lipidkonzentrationen zwischen 25 und 35 mg/ml mit einer mittleren Liposomgröße von 570 nm.

[0039] Die Produktionsanlage kann sterilisiert werden (z. B. mit Wasserdampf) und ist als aseptische Produk-

tionsanlage im Großmaßstab mit geschlossenem Kreislauf geplant.

Beispiel 2

[0040] Das Beispiel 1 wurde in dem experimentellen Aufbau von **Fig.** 5 wiederholt, der Maßstab wurde jedoch um den Faktor vier vergrößert. 518,6 g hydriertes Sojaphosphatidylcholin (Nattermann) wurden mit 41,4 g Dicetylphosphat und 2130,0 g Chloroform in einen 3 L Glasreaktor gegeben, der mit Rührer, Heizmantel und Kühler (**1**) ausgestattet war, und wurden unter Rühren bis zur vollständigen Auflösung auf 60°C erwärmt. Die Lipidlösung wurde mittels der peristaltischen Pumpe (**2**) durch den sterilen 0,22 im Filter (**3**) filtriert. Die Lipidlösung wurde dann in die Säule aus rostfreiem Stahl 316 L mit einem Heizmantel überführt, die mit 1000 parallelen, 1 m langen Röhren (**4**) aus rostfreiem Stahl **304** gefüllt war, und der Überschuss der Lipidlösung wurde entfernt. Das Chloroform wurde verdampft und die Lipide bei 80°C trocken abgeschieden, indem Luft von unten durch die Säule zirkuliert wurde.
[0041] Der 7 L Reaktor aus rostfreiem Stahl (316 L) mit Rührer, Heizmantel, Kühler (**5**) wurde mit 2920 g Iopamidol, 4110 g Wasser, 1,87 g EDTA und 5, 50 g Tris (Zugabe von genügend HCl bis zu einem pH-Wert von 7,2) gefüllt und unter Rühren auf 90°C erwärmt, bis vollständige Auflösung erhalten wurde. Dann wurde die Iopamidollösung durch den (nicht gezeigten) sterilen Filter gegeben, mittels Zahnradpumpe (**7**) in Säule (**4**) überführt und bei 75 ° C zwischen dem Reaktor (**6**) und der Säule (**4**) eine Weile zirkuliert. Die gebildete Liposomsuspension wurde dann in dem Reaktor (**6**) gewonnen, durch den Filter (**8**) bei 75°C extrudiert und die Liposomen in dem Reaktor (**9**) gewonnen. Die Liposomlösung wurde dann unter Verwendung des Mikrofiltrationssystems (**10**) konzentriert. Typische Verhältnisse von Iod zu Lipid (I/L) für eine Reihe von Experimenten, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden, lagen im Bereich von 2,5 bis 3,5 mit Lipidkonzentrationen zwischen 25 und 35 mg/ml bei einer mittleren Liposomgröße von 570 nm. Die Schüttdichten der Lipidabscheidung variierten als Funktion der experimentellen Bedingungen und lagen schätzungsweise zwischen 0, 08 und 0, 05 g/cm^3. Die besten Liposomen wurden jedoch mit Schüttdichten zwischen 0,01 und 0,02 g/cm^3 hergestellt..

Beispiel 3

[0042] Das Beispiel 2 wurde unter Verwendung der azeotropen Mischung aus Chloroform und Methanol (87/13 = V/V) als Lösungsmittel wiederholt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde 60°C warmes destilliertes Wasser zu dem Reaktor gegeben. Die Temperatur des zugegebenen Wassers lag über der Übergangstemperatur (54°C) der verwendeten Lipide. Die erhaltene aufgeschäumte dreidimensionale Lipidabscheidung wurde hydratisieren gelassen, und die gebildeten Liposome wurden gleichförmig über die Flüssigkeit verteilt. Liposome vom MLV-Typ wurden in hoher Ausbeute gebildet. Nach etwa einer Stunde wurde die Liposomsuspension, die 5 mg/ml Lipide enthielt, bei 60°C durch eine 2 µm Polycarbonatmembran (Nuclepore) extrudiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur durch Mikrofiltration unter Verwendung eines 0,22 µm Mikrofiltersystems Prostak (Millipore) auf 30 mg/ml konzentriert.
[0043] Zu der konzentrierten Liposomsuspension wurde 1 L einer wässrigen Lösung gegeben, die 1040 g (S)-N,N'-Bis[2-hydroxy-1(hydroxymethyl)ethyl]-2,4,6-triiod-5-lactamidoisophthalamid(Iopamidol) bei 60°C enthielt, d. h. 520 g kovalentes Iod. Die resultierende Mischung (2 L) mit einer Iodkonzentration von 260 g/L wurde etwa 30 Minuten bei 60°C inkubiert, danach waren die Iodkonzentration außerhalb und innerhalb des Liposomkerns ins Gleichgewicht gekommen. Die resultierende Zubereitung wurde auf 30 g/L Lipide konzentriert. Das Verhältnis von eingeschlossenem Iod zu Lipid (I/L) betrug etwa 4,0.

Beispiel 4

[0044] Eine Glassäule (500 mm hoch und 50 mm Durchmesser) wurde mit Raschig-Ringen gefüllt und als Rieselturmreaktor betrieben. Eine Lipidlösung, die 50 g/L einer Mischung aus Distearoylphosphatidylcholin (DSPC), Cholesterin und Dicetylphosphat im Molverhältnis 5: 4 : 1 in Chloroform enthielt, wurde die Säule, die mit 35 Schichten Raschig-Ringen ausgestattet war, die über einem Nickelsieb als Träger verteilt waren, herunterrieseln gelassen, bis die letzte Schicht im unteren Bereich gründlich mit der Lösung getränkt war. Der Überschuss der Lösung wurde entfernt und ein Strom aus heißem (80°C) Stickstoff aus dem unteren Bereich aufwärts durch den Reaktor geblasen. Die Lipidabscheidung wurde 2 Stunden getrocknet. Der Stickstoffffluss wurde gestoppt und der Reaktor mit Vakuum (**1** bis **2** Torr) verbunden und die Abscheidung trocknen gelassen, bis das gesamte Chloroform entfernt war. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde bei 60°C Iomeprollösung mit einer Iodkonzentration von 260 g/L in den Reaktor gegeben. Die aufgeschäumte dreidimensionale Lipidabscheidung wurde 30 Minuten hydratisieren gelassen. Die Liposomensuspension wurde bei 60°C durch eine 2 µm Polycarbonatmembran (Nuclepore) extrudiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur auf 30 g/L Lipide konzentriert. Das Verhältnis von eingeschlossenem Iod zu Lipid (I/L) betrug mehr als 4,0.

[0045] Das gleiche Experiment wurde dann mit netzartigem Kohlenstoff, netzartigem Nickel und netzartigem, glasartigem Kohlenstoff als Säulenpackung wiederholt. Die Schüttdichten der in diesen Experimenten erhaltenen dreidimensionalen Lipidstrukturlagen zwischen 0,05 und 0,005 g/cm^3. Liposome mit Lipid-zu-Iod-Verhältnis von 3,5 bis 4,5 wurden erhalten.

Beispiel 5

[0046] Eine Glassäule (500 mm hoch und 50 mm Durchmesser) wurde mit einer Anordnung hohlen Glasperlen als inerter Packung gefüllt und als Wirbelbettreaktor (Reaktor mit fluidifiziertem Bett) betrieben. Eine Lipidlösung, die 50 g/L einer Mischung aus Dipalmitoylphosphatidylcholin(DPPC), Cholesterin und Dipalmitoylphosphatinsäure (DPPA) im Molverhältnis 5: 4 : 1 in azeotroper Mischung (69,5/30,5 V/V) aus Cyclohexan/Ethanol enthielt, wurde in die Säule eingebracht, die ein 100 mm hohes Bett aus hohlen Glaskugeln enthielt, die von einer porösen Glasfritte gehalten wurden. Die Lösung wurde die Glasperlen gründlich benetzen gelassen, und der Überschuss wurde entfernt. Ein Strom aus heißer (80°C) Luft wurde aus dem unteren Bereich aufwärts durch den Reaktor geblasen und die Kugeln fluidifiziert, bis die Lipidabscheidung fast trocken war. Der Luftstrom wurde gestoppt, der Reaktor mit Vakuum (**1** bis **2** Torr) verbunden und die Abscheidung trocknen gelassen, bis die gesamten Lösungsmittel entfernt waren. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde bei 60°C eine 4 Gew.% Lidocain·HCl-Lösung in Wasser (pH 7,2) in den Reaktor gegeben. Die gebildete Liposomenlösung wurde bei 80°C durch eine 2 µm Polycarbonatmembran (Nuclepore) extrudiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur auf 35 mg/ml Lipid konzentriert. Das Verhältnis von eingeschlossenem Lidocain in Liposomen betrug 0,35 mmol Lidocain/g Lipid.

[0047] Verschiedene Expansionen (20 bis 80%) des Betts während der Fluidifizierung zeigten wenig Einfluss auf die Qualität der Abscheidung.

Beispiel 6

[0048] Das Beispiel 4 wurde unter Verwendung einer 500 mm hohen Glassäule ohne Inertpackung wiederholt. Die Säule wurde mit 100 ml Lipidlösung (80 g/L) gefüllt, die aus azeotropen Mischungen aus Ethanol/Cyclohexan, Chloroform/Methanol und Isopropanol/Hexan hergestellt waren. Das organische Lösungsmittel wurde zuerst bei 55°C und 300 mm Hg Druck und danach 70°C und 10 mm Hg verdampft, bis sich eine geschäumte trockene Ablagerung gebildet hatte. In allen Fällen wurde die erhaltene dreidimensionale aufgeschäumte Lipidstruktur dann bei 70°C mit einer wässrigen Lösung von Iomeprol hydratisiert, um eine liposomverkapselte Iomeprolsuspensionen herzustellen. Nach Extrusion bei 70°C durch eine 0,6 µm Polycarbonatmembran (Nuclepore) wurde die Liposomsuspension konzentriert. Typische Iod-zu-Lipid-Verhältnisse (I/L) für eine Anzahl von Experimenten, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden, lagen im Bereich von 1,9 bis 2,5 mit Lipidkonzentrationen zwischen 25 und 35 mg/ml. Die Schüttdichten der aufgeschäumten Lipidstruktur wurden auf 0,05 bis 0,001 g/cm^3 geschätzt.

Patentansprüche

1. Liposomvesikelvorläufer in Form einer trockenen Lipidabscheidung enthaltend Phospholipide, ausgewählt aus Phosphatidsäure, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol und Mischungen davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lipidabscheidung eine poröse, dreidimensionale aufgeschäumte Struktur mit einer Schüttdichte von weniger als 0,1 g/cm^3 ist.

2. Vesikelvorläufer nach Anspruch 1, bei dem die Lipide weiter Substanzen enthalten, die aus Dicetylphosphat, Cholesterin, Ergosterin, Phytosterin, Sitosterin, Lanosterin, α-Tocopherol, Stearinsäure, Stearylamin und Mischungen davon ausgewählt sind.

3. Vesikelvorläufer nach Anspruch 1, bei dem die trockene Lipidabscheidung aus Phospholipiden besteht, wie in Anspruch 1 definiert, gegebenenfalls gemischt mit anderen Substanzen, wie in Anspruch 2 definiert.

4. Vesikelvorläufer nach Anspruch 1, 2 oder 3, bei dem die Schüttdichte der aufgeschäumten, dreidimensionalen Lipidabscheidung unter 0,08 g/cm^3 liegt.

5. Vesikelvorläufer nach Anspruch 4, bei dem die Schüttdichte der aufgeschäumten, dreidimensionalen Lipidabscheidung zwischen 0,05 und 0,001 g/cm^3 liegt.

6. Vesikelvorläufer nach Anspruch 5, bei dem die Schüttdichte der aufgeschäumten, dreidimensionalen Lipidabscheidung zwischen 0,02 und 0,01 g/cm^3 liegt.

7. Vesikelvorläufer nach Anspruch 1, bei dem die aufgeschäumte, dreidimensionale Struktur durch ein Netzwerk eines inerten porösen Materials gestützt wird.

8. Vesikelvorläufer nach Anspruch 7, bei dem das inerte poröse Material eine Anordnung von Röhren oder eine Anordnung von inertem Füllmaterial enthält.

9. Vesikelvorläufer nach Anspruch 8, bei dem das Röhrenmaterial einen inneren Durchmesser zwischen 0,5 mm und 5 mm und eine Wanddicke zwischen 0,5 und 2 mm aufweist.

10. Vesikelvorläufer nach Anspruch 8, bei dem das inerte Füllmaterial aus hohlen Glaskugeln, netzartigem Kohlenstoff, netzartigem glasartigem Kohlenstoff, netzartigem Metall, Glas- oder Metallwolle und Glas- oder Metallfasern ausgewählt ist.

11. Verfahren zur Herstellung von Liposomenvesikeln mit verbesserter Einschlußkapazität, bei dem man ein oder mehrere filmbildende Lipide in mindestens einem organischen Lösungsmittel löst, man durch Verdampfen des Lösungsmittels eine Lipidabscheidung bildet, man aus der organischen Lösung und vor dem Kontaktieren der Lipidabscheidung mit einer wässrigen Trägerphase die Lipidabscheidung zu einer dreidimensionalen Struktur aufschäumt, deren Schüttdichte unter 0,1 g/cm^3 liegt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem die Schüttdichte unter 0,08 g/cm^3 liegt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, bei dem die Schüttdichte zwischen 0,05 und 0,001 g/cm^3 liegt.

14. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem das Reaktionsgefäß ein Netzwerk eines inerten porösen Materials oder Füllmaterial enthält, das als Träger oder Matrix für die Abscheidung der Lipide dient.

15. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem das Füllmaterial aus netzartigem Kohlenstoff, netzartigem glasartigem Kohlenstoff, netzartigem Metall, Glas- oder Metallwolle und Glasoder Metallfasern ausgewählt ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem das inerte poröse Füllmaterial hohle Glaskugeln sind, die fluidifiziert sind.

17. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem das inerte Füllmaterial Raschig-Ringe enthält, die in eine Säule als dem Reaktionsgefäß gepackt sind, und die Lipidlösung tropfenweise von oben eingebracht wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, bei dem nach dem Verdampfen des organischen Lösungsmittels die Lipidabscheidung mit einer wässrigen Trägerphase kontaktiert wird, die am unteren Ende der Säule eingebracht wird.

19. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem das Abdampfen bei oder oberhalb der Umgebungstemperatur oder bei vermindertem Druck durchgeführt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 11 oder 14, bei dem das Abdampfen durch das Blasen von Luft oder einem inerten Gas, vorzugsweise Stickstoff, durch das Reaktionsgefäß bewirkt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 11 oder 14, bei dem das organische Lösungsmittel aus Chloroform, Petrolether, Methanol, Ethanol Propanol, Isopropanol, n-Butanol, tert-Butanol, Pentanol, Hexanol, Pentan, Hexan, Heptan, Cyclohexan und Mischungen davon ausgewählt ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, bei dem das organische Lösungsmittel eine azeotrope Mischung von zwei Lösungsmitteln ist.

23. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Lösungsmittel eine Mischung von Ethanol und Cyclohexan, Chloroform und Methanol oder Isopropanol und Hexan ist.

24. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem die wässrige Trägerphase eine biologisch aktive Substanz enthält.

25. Verfahren nach Anspruch 24, bei dem die aktive Substanz ein Kontrastmittel ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, bei dem das Kontrastmittel ein iodiertes Röntgenkontrastmittel ist.

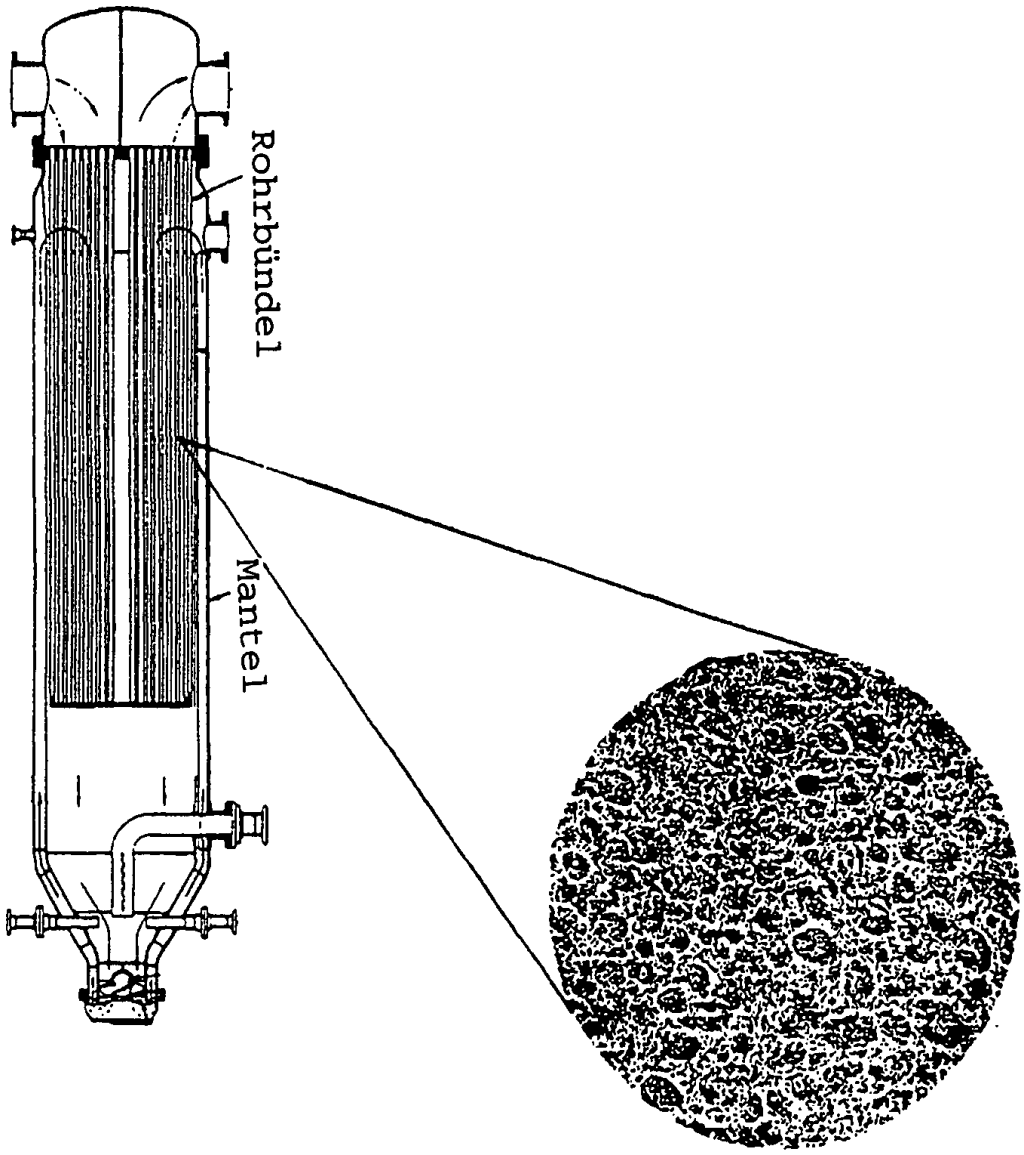
27. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem das Verhältnis von Iod zu Lipid der Liposomvesikel mindestens 2,75 beträgt.

28. Verwendung der dreidimensionalen Lipidstrukturen der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung von Liposomen mit hoher Einschluflkapazität.

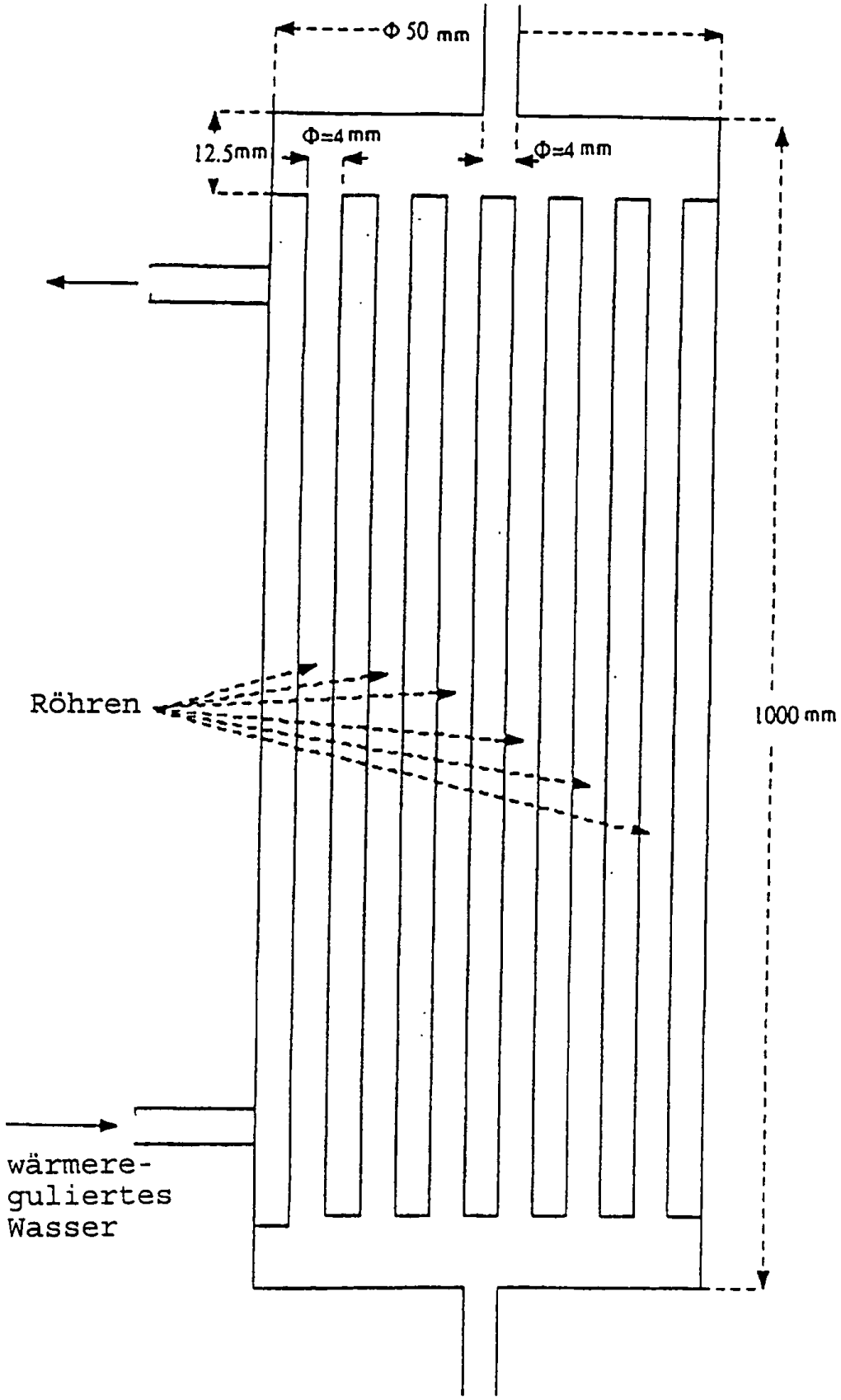
29. Verwendung der dreidimensionalen Lipidstrukturen der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung von diagnostischen Kontrastmitteln.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

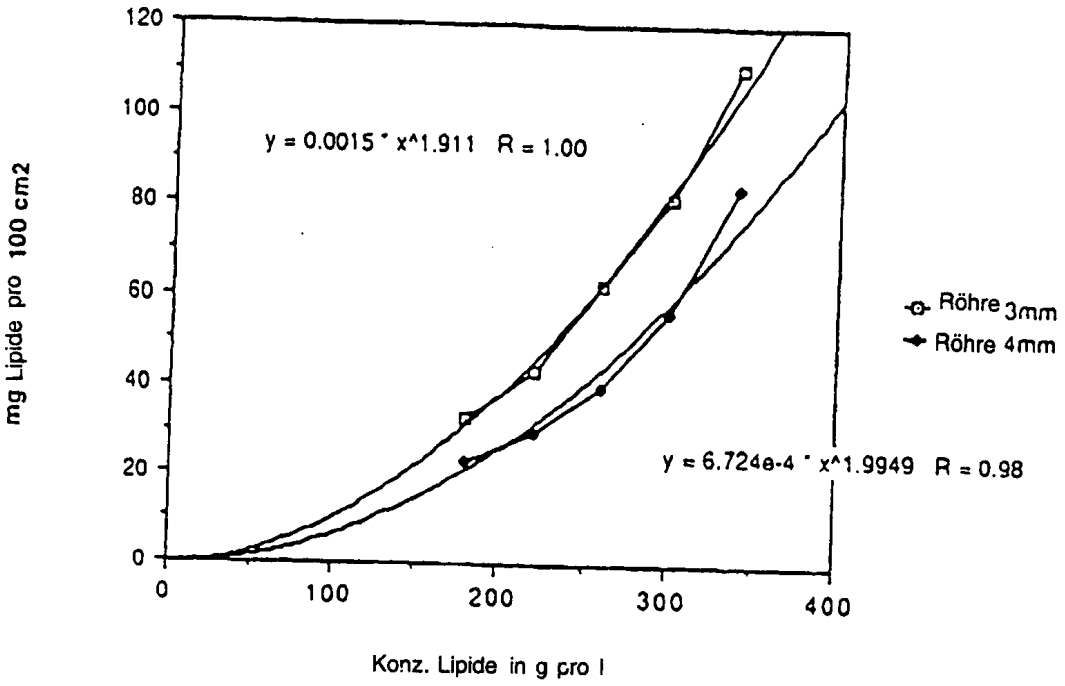
Anhängende Zeichnungen



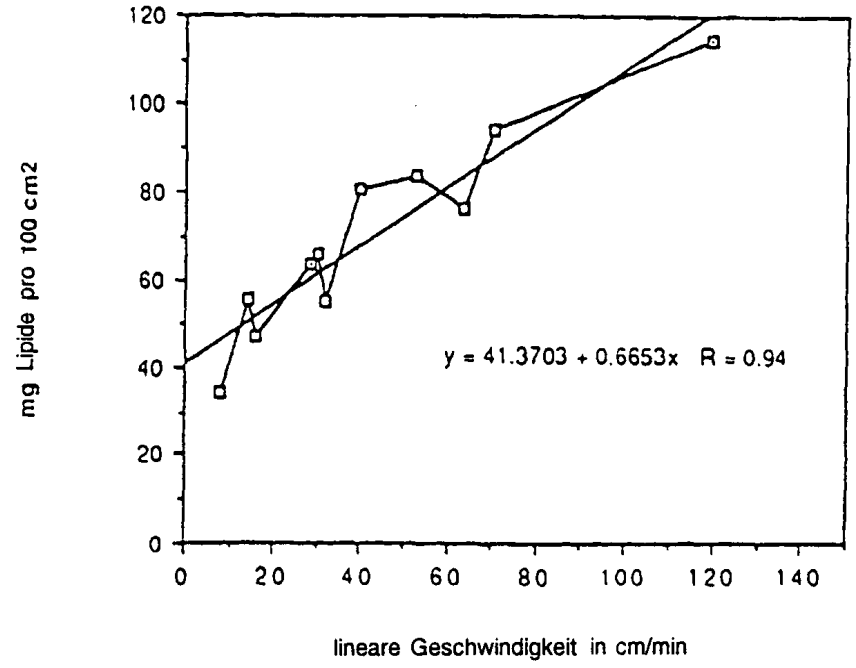
FIGUR 1


Φ 50 mm
12.5mm
Φ=4 mm
Φ=4 mm
Röhren
1000 mm
wärmere-
guliertes
Wasser

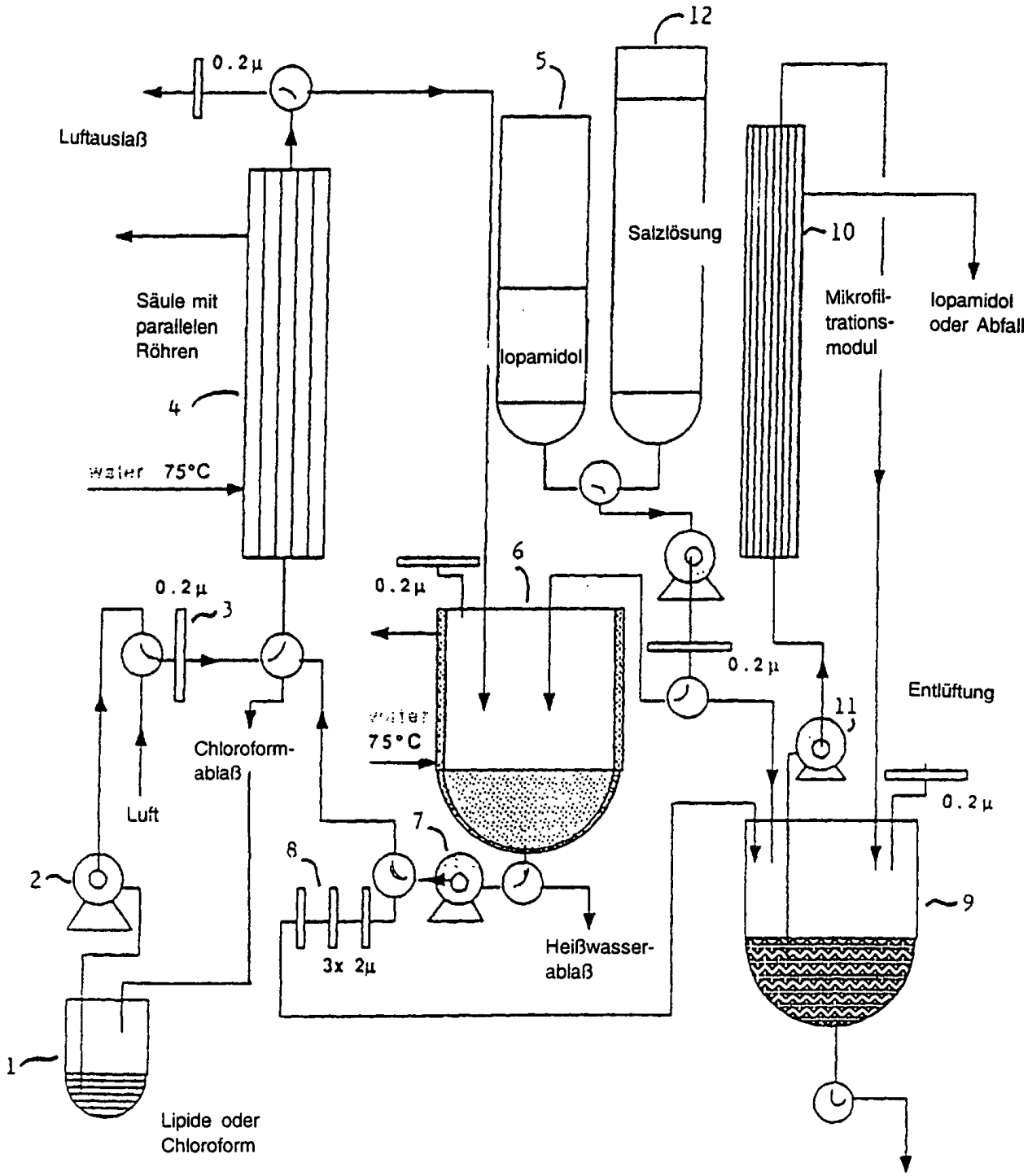
FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4


12
0.2µ
5
Luftauslaß
Salzlösung
10
Säule mit
parallelen
Röhren
Iopamidol
Mikrofil-
trations-
modul
Iopamidol
oder Abfall
4
Water 75°C
6
0.2µ
0.2µ
3
0.2µ
Entlüftung
11
Chloroform-
ablaß
Water
75°C
Luft
7
0.2µ
2
8
9
3x 2µ
Heißwasser-
ablaß
1
Lipide oder
Chloroform

FIGUR 5