(12) **PATENT**

(19) NO (11) **317053** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] A 61 K 9/127, 49/00

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19962189	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1995.09.28 PCT/IB95/00802
(22)	Inng.dag	1996.05.29	(85)	Videreføringsdag	1996.05.29
(24)	Løpedag	1995.09.28	(30)	Prioritet	1994.09.30, EP, 94810570
(41)	Alm.tilgj	1996.07.23			
(45)	Meddelt:	2004.08.02			

(71) Søker Bracco Research SA , 7, route de Drize, CH-1227 Carouge, CH

(72) Oppfinner Michel Schneider, 34, route d'Annecy, CH-1256 Troinex, CH
Hervé Tournier, 300, le Riondet, F-74520 Valleiry, FR
Christian Guillot, Les Eplanes, F-74160 Le Cháble-Beaumont, FR

(74) Fullmektig Zacco Norway AS , Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO

(54) Benevnelse **Liposomvesikkelforløper med forøket inneslutningskapasitet samt fremgangsmåte og anvendelse derav**

(56) Anførte publikasjoner DE A1 33 35 701, EP A2 119 020 , EP A2 186 352

(57) Sammendrag

En tørr avsetning som en forløper til liposomvesikler er beskrevet. Forløperen er en tredimensjonal ekspandert struktur med bulk tetthet mellom .01 og .001 g/cm^3. Det er også beskrevet en fremgangsmåte for fremstilling av liposomvesikler med en forøket inneslutningskapasitet ved oppløsning av en eller flere filmdannende lipider i minst et organisk oppløsningsmiddel for å danne en oppløsning i en reaksjonsbeholder, avdampning av oppløsningsmiddelet for å danne en ekspandert tredimensjonal porøs lipidstruktur, kontakting av lipidavsetning et med en vandig bærerfase, og produsering av liposomvesikler som inneslutter bærerfasen samt en apparatur som omfatter en rekke rør eller en inert pakking som virker som en materialstøtte eller en matriseoverflate for deponering av lipider produsert ifølge fremgangsmåten.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en liposomvesikkelforløper i form av en tørr lipidavsetning og en fremgangsmåte for fremstilling av liposomvesikler med forøket inneslutningskapasitet ved oppløsning av en eller flere filmdannende lipider i minst ett organisk oppløsningsmiddel i en reaksjonsbeholder, deponering av lipidene ved avdampning av oppløsningsmiddelet, bringe i kontakt lipidavsetningen med en vandig oppløsningsbærerfase, og produsere liposomvesikler som inneslutter oppløsningen. Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av liposomvesikkelforløper samt anvendelse av denne.

Liposomvesikler hvor bindingskappen består av bi- eller multilag av lipidmolekyler har lenge vært kjent som medikamentleveringssystemer som kan forbedre den terapeutiske og diagnostiske effektiviteten til mange medikamenter og kontrastmidler. Eksperimenter med et antall forskjellige antibiotika og røntgenkontrastmidler har vist at bedre terapeutisk aktivitet eller bedre kontrast som gir større trygghet kan oppnås ved innkapsling av medikamentene og kontrastmidlene med liposomer. Stor interesse for liposomer som innkapslingssystemer for medikamenter har vist at en vellykket utvikling og kommersialisering av slike produkter krever reproduserbare fremgangsmåter for produksjon i stor skala av lipidvesikler med egnede karaktertrekk. Det har følgelig vært forsket på å oppnå fremgangsmåter som vil produsere liposomvesikler med nødvendig størrelse og konsentrasjon, størrelsesfordeling og inneslutningskapasitet uansett egenskapen til lipidblandingen er blitt initiert. Slike fremgangsmåter bør tilveiebringe liposomer med en vedvarende aktiv forbindelse til lipidforholdet og samtidig respektere for tiden aksepterte fremstillingsmetoder. Som et resultat av forskningen og på grunn av det faktum at liposomens adferd kan variere vesentlig med forskjellige produksjonsparametere er det nå blitt foreslått mange forskjellige fremstillingsmetoder.

Konvensjonelle liposomfremstillingsmetoder innbefatter et antall trinn hvor multi- eller bilags-dannende komponenter (fosfolipider eller blandinger av fosfolipider med andre lipider for eksempel kolesterol) blir oppløst i et flyktig organisk oppløsningsmiddel eller en oppløsningsmiddelblanding i en rundbundet flaske etterfulgt av avdampning av oppløsningsmidler under betingelser (temperatur og trykk) som vil forhindre faseseparasjon. Ved fjerning av oppløsningsmiddelet blir en tørr lipidblanding, vanligvis i form av en lipiddeponering på veggene til reaktoren, hydrert med et vandig medium som kan inneholde oppløste buffere, salter, kondisjoneringsmidler og en aktiv forbindelse som skal innesluttes. Liposomene vil bli dannet i hydreringstrinnet hvorved en andel av det vandige mediet blir innesluttet i liposomene. Hydreringen kan bli utført med eller uten aktivisering av oppløsningen ved omrøring, sonikering eller

mikrofluidisering med påfølgende ekstrusjoner gjennom en eller flere polykarbonat filtre. Den frie ikke-innkapslede aktive forbindelsen kan bli separert for isolering og produktet blir filtrert, sterilisert, eventuelt lyofilisert og pakket.

Hydrering, mer enn noe annet trinn, influerer på typen av liposomer som blir dannet (størrelse, antall lipidlag, innesluttet volum). Egenskapen til det tørkede lipidet, dets overflateareal og porøsitet er spesielt viktig. Det er følgelig blitt oppdaget at hydrering og inneslutningsprosessen er mest effektiv når filmen til tørrlipidene holdes tynn. Dette betyr at desto større lipidmengde, desto større overflate for deponering av lipidene er nødvendig og betyr også at til tross for at glasskuler og andre inerte uoppløselige partikler blir anvendt for å øke overflatearealet tilgjengelig for filmdeponering forblir tynn-film fremgangsmåten i hovedsak en laboratoriemetode.

Andre fremgangsmåter for å danne liposomer som involverer injeksjon av organiske oppløsninger av lipider inn i et vandig medium med kontinuerlig fjerning av oppløsningsmiddel, anvendelse av spraytørking, lyofilisering, mikroemulgering og mikrofluidisering, osv. er blitt foreslått i et antall publikasjoner eller patenter så som for eksempel US-A-4.529.561, US-A-4.572.425 osv.

Et forsøk på å løse problemene med oppskalering av liposomproduksjonen er blitt beskrevet i US-A-4.935.171 (Vestar). Det er beskrevet en fremgangsmåte for fremstilling av liposomer i kommersielle mengder ved dannelse av en homogen og jevn lipidfilm i en tynn-film evaporator gjennom avdampning av det organiske oppløsningsmiddelet. Etter tørking av tynnlipidfilmen som blir dannet på den indre veggen av evaporatoren, blir avsetningen in situ hydrert med en vandig fase under agitering oppnådd fra rotoren.

Til tross for at oppløsningen foreslått heri ser ut til å være et trinn i riktig retning er forholdet mellom lipidfilm overflaten og reaktorvolumet bare noe, om ikke marginalt, bedre enn den til rund-bundede flasker anvendt i laboratorieskala. Reaktorens "space" tidsutbytte eller produktivitet er fortsatt for lavt for at fremgangsmåten er økonomisk og konkurransedyktig.

Forskjellige aspekter av liposomfremstilling er blitt beskrevet og et antall forbedringer og forskjellige oppløsninger på problemet med oppskalering er blitt foreslått. Dokumenter som for eksempel WO-A-86/00238, WO-A-87/00043, US-A-4.737.323. US-A-4.753-788 og US-A-4.781.871 er blitt foreslått anvendt for hurtig frysing av

tidligere fremstilte multilamellære vesikler med påfølgende fryse og tine behandling for å forbedre deres inneslutningskapasitet, anvendelse av ekstrusjonsteknikker av multilamellære liposomer for å forbedre deres størrelsesfordeling osv.

Det er frem til nå ikke blitt foreslått en industriell metode i stor skala hvor kontrollen med produksjonsparametere vil muliggjøre en reproduserbar prosess hvor store volumer av væske vil bli bearbeidet innenfor et relativt lite reaktorområde. Alle kjente prosesser i pilot eller industriell skala vil vanligvis bli koblet til små batcher hvor prosessering av store volum fortynnede liposomoppløsninger vil kreve mye plass og reaktorområde samt håndtering av store volum oppløsninger og oppløsningsmidler. På grunn av relativt små område-tid utbytter eller produktivitet til reaktorene er disse fremgangsmåtene for omfattende og alt for dyre for kommersiell produksjon i stor skala.

Foreliggende oppfinnelse omfatter liposomvesikkelforløper i form av en tørr lipiddeponering som omfatter fosfolipider valgt fra fosfatidinsyre, fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylglycerol, fosfatidylinositol og blandinger derav, kjennetegnet ved at lipiddeponeringen er en porøs tredimensjonal ekspandert struktur med bulktetthet på under 0,1 g/cm^3.

Oppfinnelsen omfatter også en fremgangsmåte for å fremstille lipisomvesikler med forsterket inneslutningskapasitet, kjennetegnet ved å oppløse én eller flere filmdannende lipider i minst ett organisk løsningsmiddel, som danner en lipiddeponering ved evaporering av løsningsmiddelet fra nevnte organiske løsning og hvor forut for kontakten med en vandig løsningsbærerfase, har nevnte lipiddeponering blitt utvidet til en porøs tredimensjonal struktur som har en bulktetthet som er under 0,1 g/cm^3.

Videre omfatter oppfinnelsen anvendelse av tredimensjonale lipidstrukturer som tidligere nevnt, for fremstilling av liposomer med høy inneslutningskapasitet, samt anvendelse av tredimensjonale lipidstrukturer som tidligere nevnt, for fremstilling av diagnostiske kontrastmidler.

De tredimensjonale lipidstrukturene ifølge oppfinnelsen er meget anvendelige for fremstilling i stor skala av liposomer med høy inneslutningskapasitet.

Når inkubert med en vandig bærerfase inneholdende et kontrastmedium er de tredimensjonale lipidstrukturene ifølge oppfinnelsen spesielt egnede for fremstilling av diagnostikse kontrastmidler.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 er et skjematisk diagram av reaktoren med et utsnitt som viser ekspandert tredimensjonal lipidstruktur.

Figur 2 er et skjematisk diagram av reaktoren med en rekke av et inert rørsystem.

Figur 3 er et plott av lipidavsetning vs konsentrasjon.

Figur 4 er et plott av lipidavsetning vs lineær hastighet.

Figur 5 er et strømningskart av produksjonen av et kontrastmedium ved anvendelse av de utvidede lipidstrukturene ifølge oppfinnelsen.

Foreliggende oppfinnelse er basert på det uventede funnet som omfatter at optimal liposomdannelse og forøket reaktorkapasitet oppnås dersom det i løpet av produksjonen av vesiklene, oppnås lipidavsetningen ved avdampning av oppløsningsmiddelet som danner en organisk oppløsning av en eller flere filmdannende lipider i minst ett organisk oppløsningsmiddel, før det bringes i kontakt med en vandig bærerfase, blir ekspandert til en tredimensjonal struktur hvor bulk tettheten er under 0.1 g/cm^3, fortrinnsvis under 0.08, mer foretrukket er mellom 0.05 og 0.001 og mer foretrukket er mellom 0.02 og 0.01. Til tross for at de spesifikke grunnene for slike uventede resultater ikke er bestemt, så er det antatt at fremgangsmåten tilveiebringer en uventet stor overflate i forhold til volum av deponeringer hvorpå påfølgende hydrering derfor er mer effektiv. Stort utbytte av liposomer med ønsket størrelse og fordeling blir følgelig produsert i fremgangsmåten som er spesielt lett å oppskalere og kontrollere. Med en stor overflate i forhold til volum, forbedrer de ekspanderte lipidstrukturene "spacetime" utbyttet til reaktorene hvorved teknikken blir industrielt meget attraktivt. I tillegg, for å lette oppskaleringen og fremme høy produktivitet tilveiebringer fremgangsmåten ytterligere fordeler som innbefatter hurtigere reaktor "turn around" tid, enkel kontroll av hydreringstrinnet, reduserte prosesstider, anvendelse av billige materialer og til slutt anvendelse av samme reaktor for deponering, oppløsningsmiddel avdampning, hydrering av utvidet lipidstruktur og sterilisering av liposomvesiklene som blir dannet.

Det er blitt oppdaget at de porøse strukturene til rene lipider ifølge oppfinnelsen har meget store overflater i forhold til volum. På grunn av at skjørheten til den ekspanderte

strukturen er større, kunne det nøyaktige overflatearealet til enheten volum eller vekt til den ekspanderte lipidstrukturen ikke ha blitt etablert med større nøyaktighet. En konservativ vurdering av det totale overflatearealet til 1 g ekspandert struktur ifølge oppfinnelsen tyder på at det totale overflatearealet kan variere mellom 0.1 og 50 m^2 som impliserer overflate til volumforhold på mellom 10 til 0.5 c 10^5.

Den ekspanderte tredimensjonale lipidstrukturen kan bli oppnådd ved avdampning av det organiske oppløsningsmiddelet fra en reaksjonsbeholder som inneholder et inert porøst nettverk eller en bærer som virker som en materiell bærer eller en matriseoverflate for avsetning av lipidene. Det inerte nettverket kan være av et hvilket som helst hensiktsmessig materiale med en relativt stor overflate i forhold til volum og kan innbefatte en rekke rør eller en rekke inerte pakkinger så som hule glassfærer, retikulært karbon, retikulært vitrøs karbon, retikulært metall, glass, keramikk eller metallull og glass, keramikk eller metallfibre. Når en rekke rør blir anvendt bør rørdimensjonene bli valgt slik at maksimalt forhold av overflate til volum blir oppnådd. Eksperimentene utført i løpet av utviklingen og karakterisering av reaktoren ifølge oppfinnelsen har vist at i en gitt konfigurasjon har rør med en indre diameter på mellom 0.5 mm og 5 mm og veggtykkelser mellom 0.5 og 2 mm gitt gunstige resultater, men andre konfigurasjoner av reaktoren kan favorisere andre rørdimensjoner. Det er oppdaget at på grunn av at lipidoppløsningen er spredd over indre og ytre overflate av røret ved hjelp av tyngekraften er en rekke vertikalt arrangerte rør foretrukket til tross for at et helisk arrangement også er mulig.

For å lette jevn deponering av lipidfilmene kan de inerte pakkingene forsiktig bli fluidisert eller reaktoren kan bli pakket med Raschig ringer eller et hvilket som helst annet inert materiale slik at det ovennevnte kan bli tilført med lipidoppløsningen fra toppen og latt være slik at det forsiktig siver nedover pakkingen. Det antas at meget gode resultater oppnådd i drypptårn arrangementet er på grunn av det faktum at en effektiv kontroll av deponeringstykkelsen oppnås ved dryppmåten av å kontakte lipidoppløsningen og bæreren. Overskuddsvæsken blir konstant fjernet og jevn væsketykkelse på hele overflaten av bæreren blir følgelig sikret. For å ytterligere assistere jevn dannelse av belegget av lipidoppløsningen av den pakkede luften eller en inert gass så som nitrogen, kan denne bli ført inn mot-strøms i en tidsperiode. Gassen er vanligvis kald, men under visse betingelser kan det være ønskelig at temperaturen til gassen blir valgt slik at tørking og utvidelse av lipidfilmen blir assistert eller utført ved anvendelse av en varm gass.

Etter tørking og ekspandering av deponeringen bestående av rene eller lipider med vanlig grad av renhet inn i den tredimensjonale strukturen, blir deponeringen brakt i kontakt med en vandig bærefase. Avhengig av konfigurasjonen til reaktoren kan bærerfasen bli innført ved den lavere enden av reaktoren, for eksempel når det gjelder drypptårnet eller fluidisert sjiktkonfigurasjon eller i toppen av reaktorkolonnen (i tilfelle fiksert rekke rør). Den vandige bærefasen som blir anvendt kan være ren eller kan inneholde biologiske aktive forbindelser, kontrastmidler eller begge. En hvilken som helst biologisk aktiv forbindelse kan bli innesluttet i liposomene produsert ifølge oppfinnelsen. Slike forbindelser innbefatter, men er ikke begrenset til, antibakterielle forbindelser så som gentamycin, antivirale forbindelser så som rifamyciner, antisoppforbindelser så som amfotericin B, antiparasittiske forbindelser så som derivater av antimony, antineoplastiske forbindelser så som mitomycin C, doksorubicin og cisplatina, proteiner så som albumin og lipo-proteiner, immunoglobuliner, toksiner så som difteri toksin, enzymer så som katalase, hormoner, neurotransmittere, radioopakforbindelser så som ^{99}Tc, fluorescensforbindelser så som karboksyfluorescein, anti-inflammatoriske midler så som salicylsyre og ibuprofen, anestesimidler så som dibukain eller lidokain osv.

Meget gode resultater og høy inneslutningsbelastninger blir oppnådd med jodinerte røntgenkontrastmidler så som iopamidol, iomeprol, ioheksol, iopentol, iotrolan, iodixanol, ioglukol osv. Jodin til lipidforholdet til liposomvesiklene ifølge oppfinnelsen er minst 2,75.

Avdampning av det organiske oppløsningsmiddelet eller blandingen av oppløsningsmidler blir utført ved ovennevnte romtemperaturer eller redusert trykk eller begge. Eksperimenter har vist at avdampningsraten har en sterk innvirkning på ekspansjonsgraden til lipidstrukturen. For optimal ekspansjon vil man hensiktsmessig kontrollere mengden av varme og trykk innenfor reaktoren. Kontrollen blir spesielt viktig ved slutten av oppløsningsmiddelavdampningen, dvs. når oppløsningen blir tykk og viskøs. Ved dette tidspunktet vil en viss reduksjon av trykk resultere i en relativt hurtig ekspansjon (omdannelse). Det er blitt oppdaget at ved balansering av temperatur og trykk til et gitt oppløsningsmiddel eller oppløsningsmiddelblanding kan forskjellige ekspansjonsgrader av lipiddeponeringen bli oppnådd. Best resultater oppnås når det organiske oppløsningsmiddelet blir valgt fra petroleumeter, kloroform, metanol, etanol, propanol, isopropanol,n-butanol, tert-butanol, pentanol, heksanol, pentan, heksan, heptan, cykloheksan og blandinger derav. Oppløsningsmiddelet er fortrinnsvis en azeotropisk blanding av to oppløsningsmidler. Gode resultater er blitt oppnådd med

azeotropiske blandinger av etanol med cykloheksan, kloroform med metanol og isopropanol med heksan.

Lipider anvendt for produksjon av liposomvesikler er konvensjonelle og blir valgt fra syntetiske eller naturlige, mettet og/eller umettede fosfolipider, inkludert fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylglycerol, fosfatidylinositol og fosfatidinsyre. Følgende fosfolipider er spesielt nyttige dipalmitoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylglycerol, dipalmitoylfosfatidylsyre, dipalmitoylfosfatidyletanolamin og tilsvarende distearoyl- og dimyristyl- motparter og blandinger derav. Lipidene eller blandinger derav kan ytterligere inneholde forbindelser valgt fra dicetylfosfat, kolesterol, ergosterol, fytosterol, sitosterol, lanosterol, α-tocoferol, stearinsyre, stearylamin og blandinger derav.

Oppfinnelsen omfatter også en båret eller ubåret tredimensjonal struktur av ekspanderte tørre lipider med tettheter under 0.1 g/cm^3, fortrinnsvis under 0.08 g/cm^3 og mer foretrukket med tetthet på mellom 0.05 og 0.01 g/cm^3. Ved omfattes menes at den lipidporøse deponeringen er dannet på en rekke av inert bærermateriale.

Ekspanderte tredimensjonale lipidstrukturer er ekstremt nyttige for fremstilling av liposomer med høy inneslutningskapasitet, spesielt når disse liposomene blir anvendt for å bære medikamenter eller diagnostiske kontrastmidler. I et slikt tilfelle blir den porøse tredimensjonale lipidstrukturen brakt i kontakt med en vandig oppløsning inneholdende medikamentet eller det diagnostiske middelet som et aktivt ingrediens hvorved liposomene vil bli dannet og innkapsle ingrediensen. Liposomene som bærer den aktive forbindelsen blir deretter bearbeidet etter behov på konvensjonell måte. En suspensjon av "tomme" liposomvesikler, dvs. liposomvesikler som bare inneholder vandig lipidbærer kan først bli dannet. I påfølgende trinn blir disse "tomme" liposomene kontaktet med en oppløsning inneholdende et aktivt ingrediens og vesiklene applisert ved anvendelse av for eksempel trans-membrane belastningstekinner.

Oppfinnelsen omfatter videre en apparatur for fremstilling av liposomene med høy inneslutningskapasitet omfattende en reaksjonsbeholder med et innløp og et utløp, en kobling til vakuum, midler for avkjøling eller oppvarming, kontrollmidler og en pakning, kjennetegnet ved at pakningen er en rekke med nært pakkede rør med et inert materiale. Røret har indre diameter på mellom 0.5 mm og 5 mm og veggtykkelse på mellom 0.5 og 2 mm er fortrinnsvis arrangert på en vertikal måte til tross for at spiral-lignende arrangement også er mulig.

Følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen ytterligere:

Eksempel 1

Reaktorkarakterisering

En vertikal, termoregulert, 1 meter høy, 316L rustfri stålkolonne med indre diameter på 50 mm utstyrt i bunnenden med en metallrist ble fylt med 12 rustfrie stålrør. Den indre diameteren på røret var 4 mm og veggtykkelsen var 1 mm. Før plassering i reaktoren ble røret "spot welded" for å danne en rekke parallelle rør. Den samme reaktor konfigurasjonen, men med rør på 2 mm og 3 mm diameter ble også dannet og testet.

Før testene rettet mot ekspandering av lipiddeponeringene ble karakterisering av reaktoren utført ved deponering av ikke-ekspanderte lipidfilmer ved anvendelse av følgende lipidsammensetning: hydrogenert soyalecitin/dicetylfosfat i 9:1 molart forhold. Eksperimenter ble utført for å bestemme de beste forutsetningene for deponering av lipidene i rørene og å etablere virkningen av lipidkonsentrasjonen, indre diameter og naturen til rørene og dreneringsraten til lipidoppløsningen. I alle tilfellene ble lipidoppløsningene i kloroform innført i rørene ved romtemperatur og etter fylling av rørene fra bunnen ble lipidoppløsningene drenert ved en kontrollrate. Deponeringen ble tørket ved 80°C under nitrogen ved avdampning av oppløsningsmiddelet og den tørre deponeringen ble skylt tre ganger med en liten mengde kloroform.

TABELL 1

Lipid kons. g/l	Lipid deponert i mg lipid/100 cm^2	
	3 mm rør	4 mm rør
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

Som vist i tabell 1 og figur 3 vil mengdene av lipider deponert ved forskjellige lipidkonsentrasjoner og to forskjellige diametere av rustfrie stålrør med lipidbelegg øke med en økning av lipidkonsentrasjonen. I tillegg oppnås tykkere deponeringer pr enhetsareale i 3 mm rør enn i 4 mm. I begge tilfellene ser mengdene av lipiddeponeringene ut til å være proporsjonale med kvadraten av lipidkonsentrasjonen.

Det fremgår av tabell 2 at mengden av lipider deponert øker med dreneringsraten. Dersom disse resultatene blir uttrykt som en funksjon av dreneringshastigheten (i cm pr minutt) i stedet for drenasjestrømningsraten (i ml pr min.) ser mengder av lipid deponert ut til å være nesten proporsjonale med den lineære hastigheten. Dette uavhengig av rørstørrelsen. Se figur 4.

TABELL 2

Dreneringsrate ml/min	Lipider deponert i mg lipid/100 cm^2 i et rør med		
	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

Ytterligere eksperimenter ble utført i et identisk oppsett, men ved anvendelse av glassrør i stedenfor rustfritt stålrør har vist at det er ingen vesentlige forskjeller mellom de to bærerene med hensyn på lipiddeponering. Homogenisiteten til lipidbelegget ble bestemt ved kutting av belagte stålrør fra toppen i 10 cm intervaller og måling av filmtykkelsen. Resultatene oppnådd er angitt i tabell 3.

TABELL 3

Fraksjon	Lipider deponert i mg	
	3 mm rør	4 mm rør
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
Gjennomsnitt ± S.D.	6,68 ± 1,33	5,51 ± 1,24

Beregning av tilsynelatende (bulk) tettheter til lipiddeponeringene oppnådd i tre forskjellige reaktorkonfigurasjoner har vist at for 2 mm rør var bulktetthetene mellom 0.04 og 0.06 g/cm^3 for 3 mm rør mellom 0.02 og 0.04 g/cm^3 og for 4 mm rør var bulktetthetene mellom 0.01 og 0.03 g/cm^3.

Liposomproduksjon

Etter karakteriseringen ble en rotor med 250 rustfrie stålrør fremstilt og koblet i en krets vist i figur 5. 26 g hydrogenert soyafosfatidylcholin (Nattermann) med 2 g dicetylfosfat og 106 g kloroform ble plassert i 1 liter glassreaktor utstyrt med rører, varmekappe og kondensator (1) og oppvarmet til 60°C under omrøring helt til fullstendig oppløst. Lipidoppløsningen ble filtrert gjennom sterilt filter (3) og applisert på 316 l rustfri stålkolonne med en varmekappe fulgt med 250 parallelle 1 m lange 304 rustfrie stålrør (4) ved hjelp av peristaltisk pumpe (2). Oppløsning i overskudd ble fjernet, oppløsningsmiddelet avdampet og lipidene avsatt ved 80°C ved sirkulerende luft fra bunnen av kolonnen.

2 liter glassreaktor med rører, varmekappe, kondensator (5) ble fylt med 849 g iopamidol, 1196 g vann, 0.54 g EDTA og 1,60 g Tris og oppvarmet ved 90°C under

omrøring helt til fullstendig solubilisering ble oppnådd. Iopamidol oppløsningen ble deretter filtrert, overført til glassreaktoren (6) og derfra til kolonnen (4). Oppløsningen ble sirkulert ved 75°C mellom reaktoren (6) og kolonnen (4) ved hjelp av gearpumpe (7). Liposomsuspensjonen som ble dannet ble deretter ekstrudert gjennom filteret (8), isolert i reaktoren (9) og deretter konsentrert ved anvendelse av mikrofiltreringssystemet (10) ved hjelp av pumpe (11). Den konsentrerte oppløsningen ble vasket med saltvann (12) for å eliminere fri iopamidol (diafiltrering). Typiske jod til lipidforhold (I/L) for et antall eksperimenter kjørt under forskjellige eksperimentelle betingelser var i området 2,5-3,5 med lipidkonsentrasjoner mellom 25 og 35 mg/ml med gjennomsnittlig liposomstørrelse på 570 nm.

Produksjonsenheten kan bli sterilisert (for eksempel damp) og ble sett på som en lukket-krets aseptisk produksjonsenhet i stor skala.

Eksempel 2

Eksempel 1 ble gjentatt i det eksperimentelle oppsettet vist i figur 5, men størrelsen ble skalert opp med en faktor på 4. 518,6 g hydrogenert soyafosfatidylcholin (Nattermann) med 41,4 g dicetylfosfat og kloroform 2130,0 ble plassert i 3 liter glassreaktor utstyrt med rører, varmekappe og kondensator (1) og varmet til 60°C under omrøring helt til dette var fullstendig oppløst. Lipidoppløsningen ble filtrert på 0,22 µm steril filter (3) ved anvendelse av peristaltisk pumpe (2). Lipidoppløsningen ble deretter overført på 316 l rustfri stålkolonne med en varmejakke fylt med 1000 parallelle 1 m lange 304 rustfrie stålrør (4) og overskudd av lipidoppløsning fjernet. Kloroform ble avdampet og lipidene tørrdeponert ved 80°C ved sirkulering av luft fra bunnen av kolonnen.

7 liter rustfritt stål (316 l) reaktor med rører, varmejakke, kondensator (5) ble tilført 2920 g iopamidol, 4110 g vann, 1,87 g EDTA og 5,50 g tris (HCl qsp for pH 7,2) og oppvarmet ved 90°C under omrøring helt til fullstendig oppløsning ble oppnådd. Iopamidol oppløsningen ble deretter sendt gjennom et sterilt filter (ikke vist), overført til kolonnen (4) ved anvendelse av gearpumpe (7) og sirkulert ved 75°C mellom reaktor (6) og kolonne (4) i en stund. Liposomsuspensjonen som ble dannet ble isolert i reaktoren (6), ekstrudert gjennom filteret (8) ved 75°C og liposomene isolert i reaktor (9). Liposomoppløsningen ble deretter konsentrert ved anvendelse av mikrofiltreringssystem (10). Typiske jod til lipidforhold (I/L) for et antall eksperimenter kjørt under forskjellige eksperimentelle betingelser var i området 2,5-3,5 med lipidkonsentrasjoner mellom 25 og 35 mg/ml med gjennomsnittlig liposomstørrelse på 570 nm. Bulktettheten til lipiddeponeringen varierte som en funksjon av de eksperimentelle betingelsene og ble

vurdert å være mellom 0.08 og 0.05 g/cm^3. De beste liposomene ble dannet med bulktettheter på mellom 0.01 og 0.02 g/cm^3.

Eksempel 3

Eksempel 2 ble gjentatt ved anvendelse som oppløsningsmiddel azeotropisk blanding av kloroform og metanol (87/13 = v/v). Etter avdampning av oppløsningsmiddel under redusert trykk ble 60°C varmedestillert vann tilsatt til reaktoren. Temperaturen til vannet som ble tilsatt var over overgangstemperaturen 54°C (av lipidene anvendt). Den ekspandert tredimensjonale lipiddeponeringen oppnådd ble hydrert og liposomene som ble dannet ble fordelt homogent gjennom væsken. Liposomene av MLV type ble dannet i høyt utbytte. Etter omtrent 1 time ble liposomsuspensjonen inneholdende 5 mg/ml lipider ekstrudert ved 60°C gjennom en 2 µm polykarbonatmembran (Nucleopore) og etter avkjøling til romtemperatur konsentrert til 30 mg/ml ved mikrofiltrering ved anvendelse av et 0,22 µm mikrofiltersystem Prostak (Millipore).

Til den konsentrerte liposomsuspensjonen ble det tilsatt 1 liter av en vandig oppløsning inneholdende 1040 g (S)-N,N'-bis [2-hydroksy-1-(hydroksymetyl)-etyl]-2,4,6-triiodo-5-laktamido-isoftalamid (iopamidol) dvs. 520 g/l kovalent jod ved 60°C. Den resulterende blandingen (2 l) med jodkonsentrasjon på 260 g/l ble inkubert i omtrent 30 min. ved 60°C hvoretter jodkonsentrasjonen utenfor og inni liposomkjernen var utlignet. Det resulterende preparatet ble konsentrert til 30 g lipider/l. Innesluttet jod til lipidforhold (I/L) var omtrent 4,0.

Eksempel 4

En glasskolonne (500 mm høy og 50 mm i diameter) ble fylt med Raschig ringer og drevet som en dryppetårn reaktor. En lipidoppløsning inneholdende 50 g/l av en blanding av distearoylfosfatidylcholin (DSPC), kolesterol og dicetylfosfat med molart forhold 5:4:1 i kloroform ble dryppet nedover kolonnen utstyrt med 35 lag Raschig ringer spredd over en nikkel mesh som en bærer helt til det siste laget i bunnen var grundig neddynket med oppløsningen. Oppløsning i overskudd ble fjernet og en strøm av varm (80°C) nitrogen ble blåst fra bunnen og opp gjennom reaktoren. Lipiddeponeringen ble tørket i 2 timer. Nitrogenstrømmen stoppet og reaktoren ble koblet til et vakuum (1-2 torr) og deponeringen ble latt tørke helt til alt kloroform var fjernet. Etter avdampning av oppløsningsmiddelet ble iomeprol oppløsning med jodkonsentrasjon på 260 g/l tilsatt ved 60°C til reaktoren. Ekspandert tredimensjonal lipiddeponering ble hydrert i 30 minutter. Liposomsuspensjonen ble ekstrudert ved 60°C

gjennom en 2 µm polykarbonatmembran (Nucleopore) og etter avkjøling til romtemperatur ble den konsentrert til 30 g lipider/l. Innesluttet jod til lipidforhold (I/L) var over 4,0.

Det samme eksperimentet ble deretter gjentatt med retikulert karbon, retikulert nikkel og retikulert glassaktig karbon som kolonnepakking. Bulktettheter til tredimensjonal lipidstruktur oppnådd i disse eksperimentene var mellom 0.05 og 0.005 g/cm^3. Liposomer med lipid til jodforhold på 3,5-4,5 ble oppnådd.

Eksempel 5

En glasskolonne (500 mm høy og 50 mm i diameter) fylt med hule glasskuler som en rekke inert pakking og drevet som en fluidisert sjiktreaktor. En lipidoppløsning inneholdende 50 g/l av en blanding av dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC), kolesterol og dipalmitoylfosfatidinsyre (DPPA) med molart forhold 5:4:1 i cykloheksan/etanol azeotropisk blanding (69,5/30,5 v/v) ble ført inn i kolonnen inneholdende en 100 mm høy sjikt av hule glassfærer understøttet av en porøs glassfritte. Oppløsningen fuktet glasskulene grundig og overskuddet ble fjernet. En damp av varm (80°C) luft ble blåst fra bunnen og gjennom reaktoren og sfærene ble fluidisert helt til lipiddeponeringen var nesten tørr. Luftstrømningen ble deretter stoppet, reaktoren koblet til et vakuum (1-2 Torr) og deponeringen tørket helt til fullstendig fjerning av oppløsningsmidlene. Etter avdampning av oppløsningsmiddelet ble en 4 vekt-% lidokain HCl oppløsning i vann (pH 7,2) ved 60°C tilsatt til reaktoren. Liposomoppløsningen som ble dannet ble ekstrudert ved 80°C gjennom en 2 µm polykarbonatmembran (Nucleopore) og etter avkjøling til romtemperatur konsentrert til 35 mg lipid/ml. Innesluttet lidokain i liposomene var 0.35 mmol lidokain/g lipid.

Forskjellige ekspansjoner (20-80%) av sjiktet i løpet av fluidiseringen viste liten innvirkning på kvaliteten av deponeringen.

Eksempel 6

Eksempel 4 ble gjentatt ved anvendelse av en 500 mm høy glasskolonne uten inert pakking. Kolonnen ble fylt med 100 ml lipidoppløsning (80 g/l) dannet fra azeotropiske blandinger av etanol/cykloheksan, kloroform/metanol og iso-propanol/heksan. Det organiske oppløsningsmiddelet ble først avdampet ved 55°C og 300 mmHg trykk og deretter 70°C og 10 mmHg helt til dannelsen av en skummet tørr deponering. I alle tilfellene ble den tredimensjonale ekspanderte lipidstrukturen som ble oppnådd hydrert ved 70°C med en vandig oppløsning av iomeprol for å produsere liposom innkapslede

iomprol suspensjoner. Etter ekstrusjon ved 70°C på en 0.6 μm polykarbonatmembran (Nucleopore) ble liposomsuspensjonen konsentrert. Typiske jod til lipidforhold (I/L) for et antall eksperimenter kjørt under forskjellige eksperimentelle betingelser var i området 1,9-2,5 med lipidkonsentrasjoner mellom 25 og 35 mg/ml. Bulktettheter til ekspandert lipidstruktur ble vurdert å være mellom 0.05 og 0.001 g/cm^3.

P a t e n t k r a v

1.
Liposomvesikkelforløper i form av en tørr lipiddeponering som omfatter fosfolipider valgt fra fosfatidinsyre, fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylglycerol, fosfatidylinositol og blandinger derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at lipiddeponeringen er en porøs tredimensjonal ekspandert struktur med bulktetthet på under 0,1 g/cm^3.

2.
Vesikkelforløperen ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at lipidene ytterligere inneholder substanser valgt fra dicetylfosfat, kolesterol, ergosterol, fytosterol, sitosterol, lanosterol, a-tokoferol, stearinsyre, stearylamin og blandinger derav.

3.
Vesikkelforløperen ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den tørre lipiddeponeringen består av fosfolipider som definert i krav 1, eventuelt blandet med andre substanser som definert i krav 2.

4.
Vesikkelforløperen ifølge kravene 1, 2 eller 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at bulktettheten av den ekspanderte tredimensjonale lipiddeponeringen er under 0,08 g/cm^3.

5.
Vesikkelforløperen ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at bulktettheten til den ekspanderte tredimensjonale lipiddeponeringen er mellom 0,05 og 0,001 g/cm^3.

6.
Vesikkelforløperen ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at bulktettheten til den ekspanderte tredimensjonale lipiddeponeringen er mellom 0,02 og 0,01g/cm^3.

7.
Vesikkelforløperen ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ekspanderte tredimensjonale strukturen er støttet av et nettverk av inert porøst materiale.

8.
Vesikkelforløperen ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inerte porøse materialet omfatter en rekke av rør eller en rekke av inert pakking.

9.
Vesikkelforløperen ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at rørene har en indre diameter på mellom 0,5 mm og 5 mm og en veggtykkelse mellom 0,5 og 2 mm.

10.
Vesikkelforløperen ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inerte pakkingen er valgt fra hule glassfærer, retikulært karbon, retikulært vitrøst karbon, retikulært metall, glass- eller metallull og glass- eller metallfiber.

11.
Fremgangsmåte for å fremstille liposomvesikler med forsterket inneslutningskapasitet, k a r a k t e r i s e r t v e d å oppløse én eller flere filmdannende lipider i minst ett organisk løsningsmiddel, som danner en lipiddeponering ved evaporering av løsningsmiddelet fra nevnte organiske løsning og hvor forut for kontakten med en vandig løsningsbærerfase, har nevnte lipiddeponering blitt utvidet til en porøs tredimensjonal struktur som har en bulktetthet som er under 0,1 g/cm^3.

12.
Fremgangsmåten ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at bulktettheten er under 0,08 g/cm^3.

13.
Fremgangsmåten ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at bulktettheten er mellom 0,05 og 0,001 g/cm^3.

14.

Fremgangsmåten ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at reaksjonsbeholderen inneholder et nettverk av inert porøst materiale eller pakking som tjener som en støtte eller matriks for deponeringen av lipidene.

15.

Fremgangsmåten ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at pakkingen blir valgt fra retikulært karbon, retikulært vitrøs karbon, retikulært metall, glass- eller metallull og glass- eller metallfibre.

16.

Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inerte porøse pakkingen er hule glassfærer som er fluidiserte.

17.

Fremgangsmåten ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inerte pakkingen omfatter Raschig-ringer pakket i en kolonne som reaksjonsbeholder og lipidoppløsningen blir innført fra toppen ved drypping.

18.

Fremgangsmåten ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at etter avdampning av det organiske oppløsningsmiddelet blir lipiddeponeringen brakt i kontakt med den vandige bærerfasen og introdusert i den lavere enden av kolonnen.

19.

Fremgangsmåten ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at avdampningen utføres over omgivende temperatur eller redusert trykk.

20.

Fremgangsmåten ifølge krav 11 eller 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at avdampningen utføres ved hjelp av blåsing av luft eller en inert gass, fortrinnsvis nitrogen, gjennom reaksjonsbeholderen.

21.

Fremgangsmåten ifølge krav 11 eller 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at det organiske oppløsningsmiddelet blir valgt fra kloroform, petroleumeter,

metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, tert-butanol, pentanol, heksanol, pentan, heksan, heptan, cykloheksan og blandinger derav.

22.

Fremgangsmåten ifølge krav 21, k a r a k t e r i s e r t v e d at det organiske oppløsningsmiddelet er en azeotropisk blanding av to oppløsningsmidler.

23.

Fremgangsmåten ifølge krav 22, k a r a k t e r i s e r t v e d at oppløsningsmiddelet er en blanding av etanol og cykloheksan, kloroform og metanol, eller isopropanol og heksan.

24.

Fremgangsmåten ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den vandige bær fasen inneholder en biologisk aktiv forbindelse.

25.

Fremgangsmåte ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t v e d at den aktive forbindelsen er et kontrastmiddel.

26.

Fremgangsmåten ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at kontrastmiddelet er et jodinert røntgenkontrastmiddel.

27.

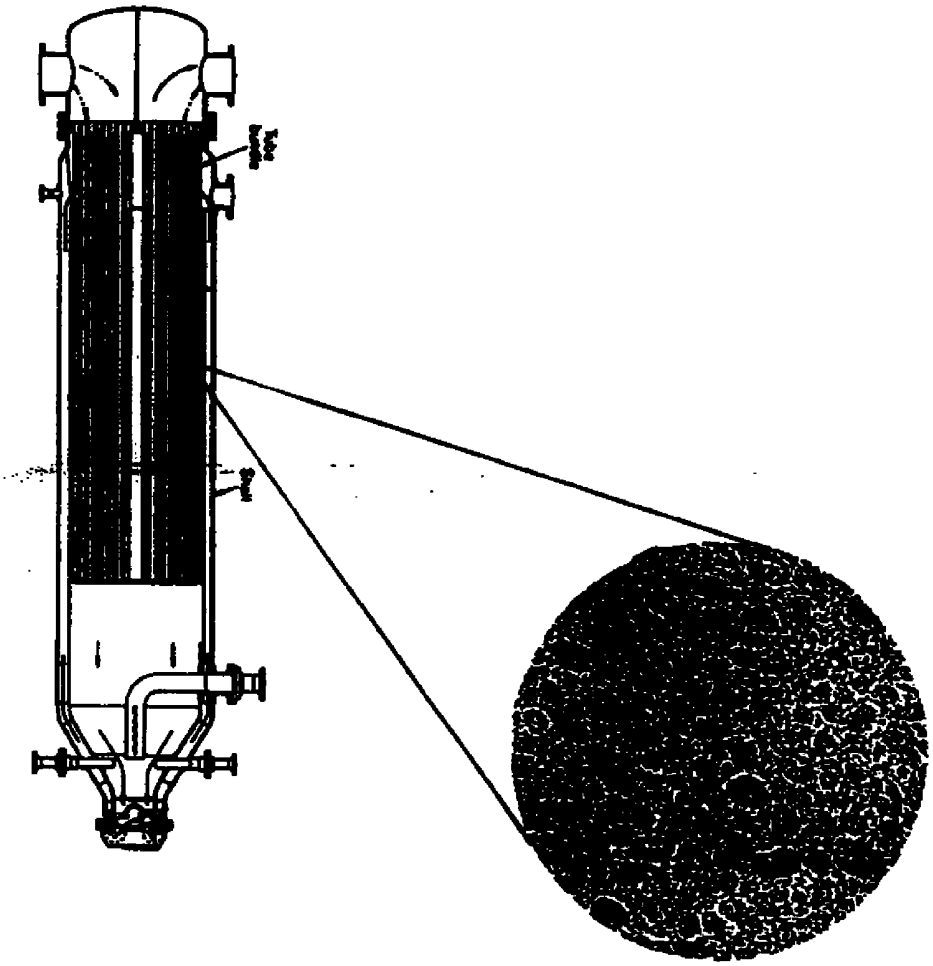
Fremgangsmåten ifølge krav 26, k a r a k t e r i s e r t v e d at jod til lipidforholdet av liposomvesiklene er minst 2,75.

28.

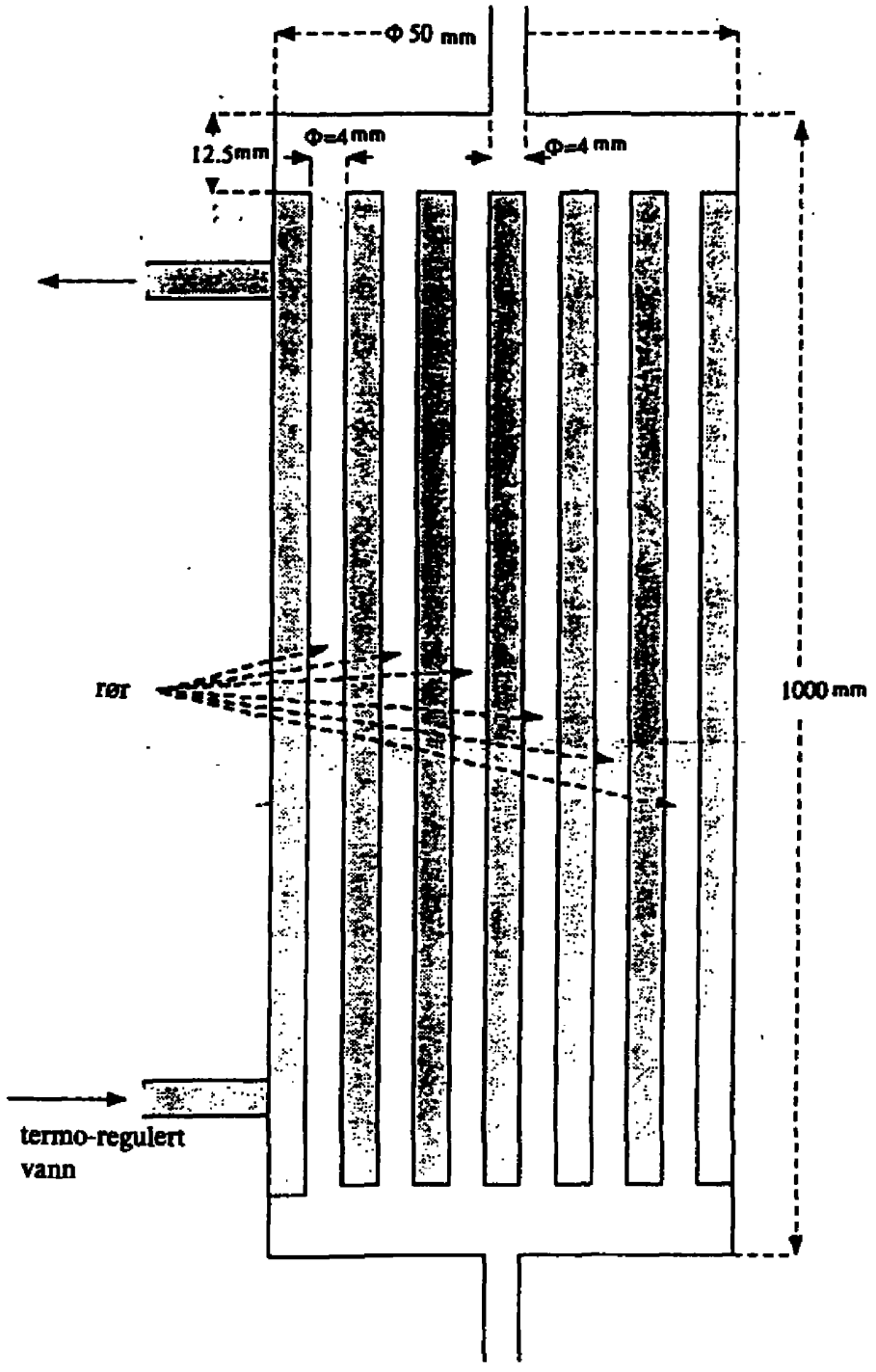
Anvendelse av tredimensjonale lipidstrukturer ifølge krav 1-10 for fremstilling av liposomer med høy inneslutningskapasitet.

29.

Anvendelse av tredimensjonale lipidstrukturer ifølge kravene 1-10 for fremstilling av diagnostiske kontrastmidler.



FIGUR 1



FIGUR 2:

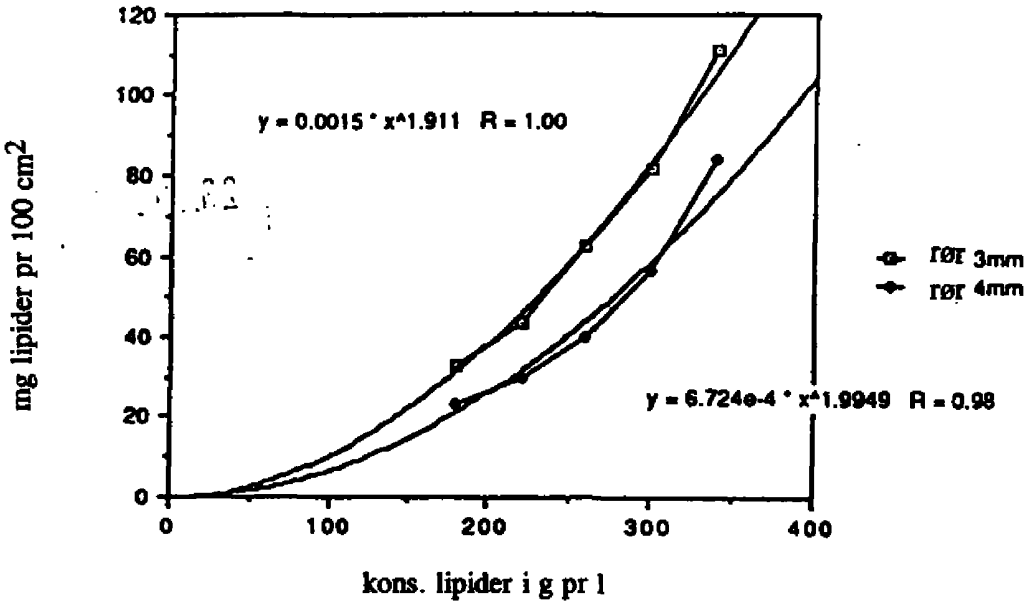
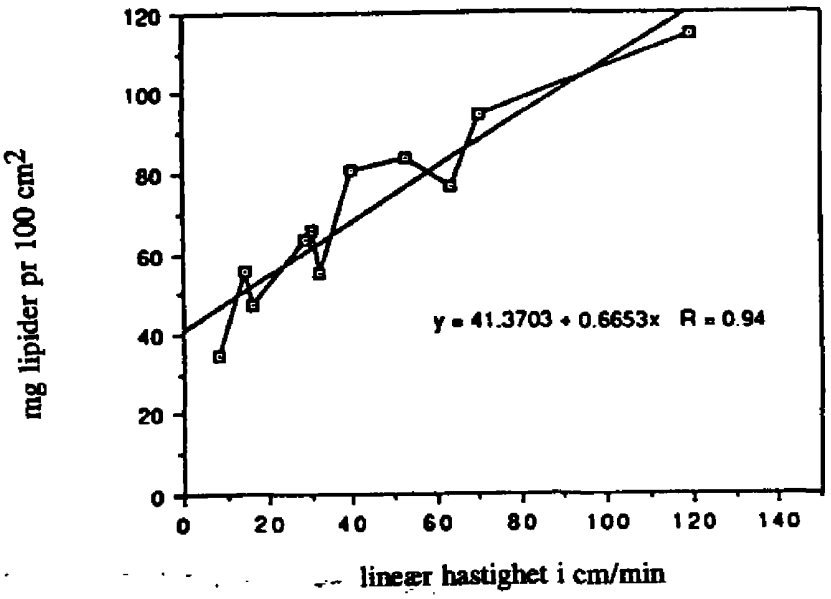


FIGURE 3



FIGUR 4

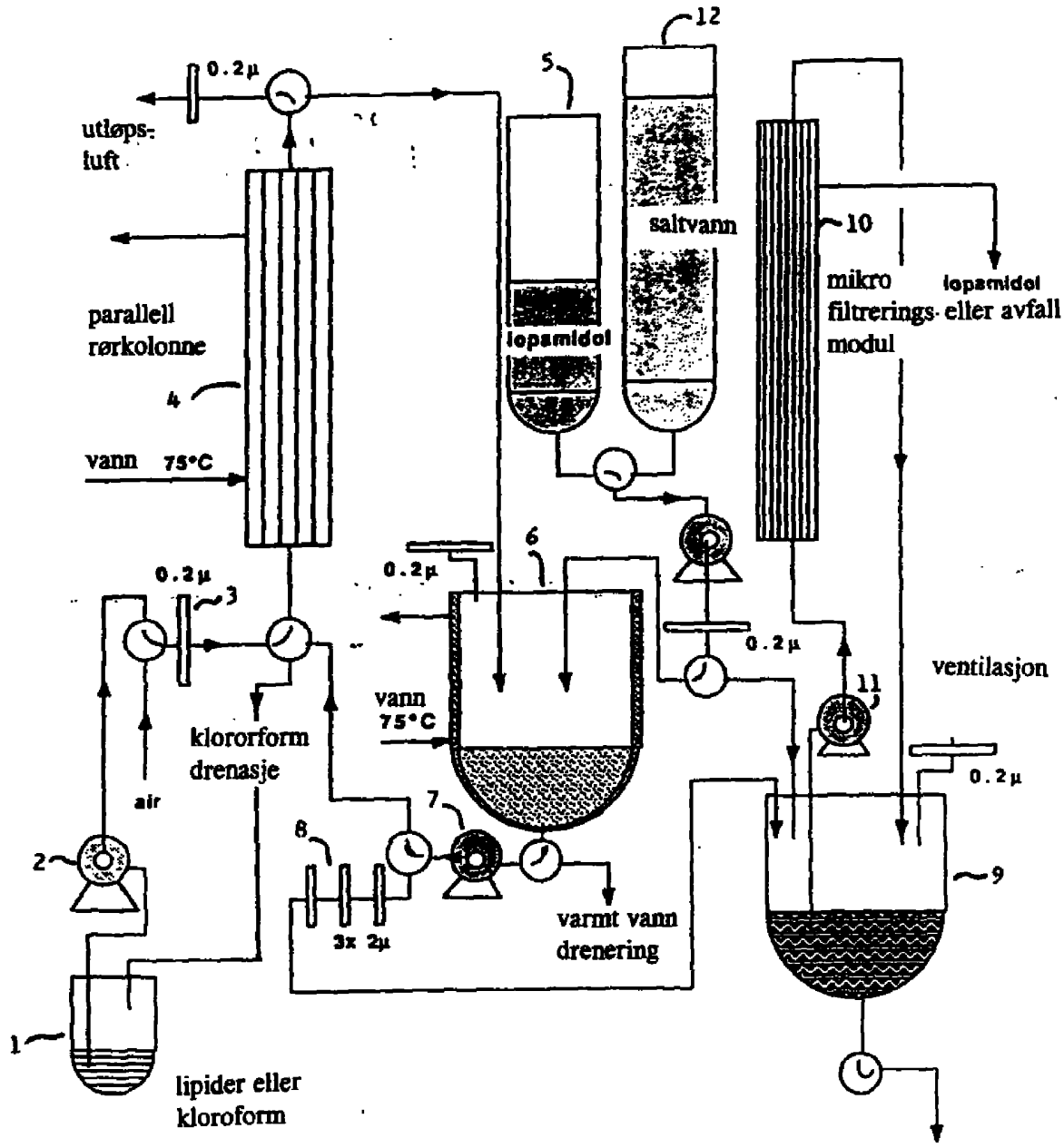

12
0.2µ
5
utløps-
luft
saltvann
10
mikro
filtrerings-
modul
Iopamidol
eller avfall
parallell
rørkolonne
Iopamidol
4
vann 75°C
6
0.2µ
0.2µ
3
0.2µ
ventilasjon
11
vann
75°C
klororform
drenasje
air
0.2µ
7
8
2
9
3x 2µ
varmt vann
drenering
1
lipider eller
kloroform

FIGURE 5