

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 164483 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2341/85

(51) Int.Cl.5

A 61 K 47/36

(22) Indleveringsdag: 24 maj 1985

A 61 K 9/127

(41) Alm. tilgængelig: 26 nov 1985

A 61 K 47/42

(44) Fremlagt: 06 jul 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 25 maj 1984 US 614255

(71) Ansøger: *Vestar Inc.; 650, Cliffside Drive; San Dimas; California 91773, US

(72) Opfinder: George Wing-Yiu *Tin; US

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til opbevaring af phospholipid liposomer

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Chem. Abstr. 97, nr. 188156k

(57) Sammindrag:

2341-85

Micellulære partikler, såsom vesicler, stabiliseres og deres holdbarhed forøges ved suspension af partiklerne i en polymergelmatrix. Partiklerne, som er suspenderet i gelmatrixen, er omgivet af en beskyttende geloverflade, som kan gøres flydende til omdannelse af den beskyttende overflade til en vandig suspension.

DK 164483 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til opbevaring af phospholipid liposomer og mere specielt phospholipid liposomer som suspenderes i en polymer gelmatrix.

Anvendelse af micellulære partikler, såsom phospholipid vesicler (eller liposomer, som de sædvanligvis betegnes) som bærere for farmaceutiske og diagnostiske midler, har været genstand for omfattende forskning, Ryman, B.E., et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 308, 281 (1978); Gregoriadis, G., Ed., "Liposome Technology", 10 CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, Vol. II (1984); Fendler J.H., Acc. Chem. Res., 13, 7 (1980); og Weinstein J.N., et al., Science, 204, 188 (1979). Som eksempler på potentielle anvendelsesmuligheder for phospholipidvesicler kan nævnes bærere af enzymer, lægemid- 15 ler (specielt anti-tumor lægemidler), chelatdannende midler, hormoner, radionucleider, cellemodificerende stoffer, antigener, antistoffer, interferon-fremkaldere og virus delpartikler. Imidlertid er liposomer (specielt små ultralydsbehandlede vesicler) thermodynamisk 20 ustabile ved temperaturer under faseovergangstemperaturen og har tendens til at klumpe sammen eller forenes til dannelsen af store unilamellære vesicler ved lagring i længere tid, Sheetz M.P., et al., Biochemistry, 11, 4573 (1972); Lawaczeck R.L., et al., Biochem. Biophys. 25 Acta, 443, 313 (1976); Larrabee H.L., Biochemistry, 18, 3321 (1978) og Shullery S.E., et al., Biochemistry, 19, 3919 (1980):

Sammenklumpning eller sammensmeltning af de små partikler til større partikler ændrer egenskaberne af 30 vesiclerne, hvilket atter kan ændre vesiclernes permeabilitet og biofordeling in vivo, Kao Y.J., et al., Biochem. Biophys. Acta., 677, 453 (1981) og Abra R.M., et al., Biochem. Biophys. Acta., 666, 493 (1981). Det er derfor særdeles vigtigt at være i stand til at lagre 35 micellulære partikler, uden at der sker partikelaggregation eller partikelsammensmeltning med tilhørende ændring af vigtige egenskaber.

Fra Chemical Abstracts nr. 97:188156k kendes en hydrocolloid gel indeholdende liposomer til kosmetisk brug, men der kan ikke uddrages nogen lære for opbevaring af liposomer i en farmaceutisk acceptabel gel.

5 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen undgås den ovennævnte aggregation eller sammensmeltning ved lagring af micellulære partikler i en polymer gelmatrix. Matrixen kan være en naturlig eller syntetisk matrix, der danner gel ved lave temperaturer og er i stand til at
10 blive flydende f.eks. ved smeltning ved stuetemperatur eller ved en højere temperatur. Eksempler på egnede materialer af denne art er polysaccharider og polypeptider. Ved lagring ved lavere temperaturer størkner gelen og begrænser partiklernes bevægelse. Dette medfører at
15 ter en forsinkelse eller en fuldstændig undgåelse af aggregation eller sammensmeltning.

Derfor forbliver størrelsen og egenskaberne af de micellulære partikler i det væsentlige uændrede ved lagring og så længe gelen forbliver i fast form. Ved stue-
20 temperatur eller ved en højere temperatur vil gelen imidlertid smelte, og vesiclen eller andre partikler vil tilbagevende til deres oprindelige tilstand som en suspension i et vandigt medium, som kan anvendes til injektion eller til anden anvendelse på samme måde som
25 friskt fremstillede vesicler uden væsentligt at ændre egenskaberne af biofordelingen in vivo.

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til opbevaring af phospholipid liposomer ejendommelig ved, at man suspenderer liposomerne i en farmaceutisk acceptabel polymer gelopløsning til dannelselse af en suspension
30 med en beskyttende geloverflade rundt om liposomerne og afkøler suspensionen til dannelselse af en gelmatrix som begrænser bevægelsen af liposomerne; opvarmer gelmatrixen til mindst ca. stuetemperatur, hvorved gelmatrixen omdannes til en vandig suspension egnet til anvendelse.
35

Eksempler på vesicler, på hvilke fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan anvendes, er phospholipider såsom distearoylphosphatidylcholin (DSPC), dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) og dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) samt naturlige phospholipider såsom æggelecithin og sojabønnelecithin. Vesiclerne kan også indeslutte et terapeutisk middel såsom et antibiotikum og, som det vil fremgå af nedenstående udførelseseksempler, kan vesiclerne mærkes efter lagring med et radionuclid såsom ^{111}In .

Definitioner og forkortelser

I nærværende beskrivelse og krav betegner "micellulære partikler" og "miceller" partikler, stammende fra aggregationer af amphiphile molekyler, idet foretrukne amphiphiler er biologiske lipider.

"Vesicle" refererer til en micelle i en sædvanligvis sfærisk form, som ofte fås fra et lipid, som danner en tolags membran og betegnes et "liposom". Fremgangsmåder til dannelsen af sådanne vesicler er velkendte: Typisk fremstilles vesiclerne ud fra et phospholipid, f.eks. distearoylphosphatidylcholin eller lecithin og kan omfatte andre materialer såsom neutrale lipider og overfladespændingsændrende midler, såsom positivt eller negativt ladede forbindelser, antigener, antistoffer, saccharider og lecithiner. Afhængigt af fremstillingsteknikken kan vesiclen være en simpel dobbeltlaget sfærisk skal (en unilamellar vesicel) eller have mange lag (multilamellar vesicler).

Følgende forkortelser er anvendt i beskrivelsen:

DSPC	-	distearoylphosphatidylcholin
Chol	-	cholesterol
DPPC	-	dipalmitoylphosphatidylcholin
DMPC	-	dimyristoylphosphatidylcholin
DTPA	-	diethylentriaminpentaeddikesyre
EDTA	-	ethylendimintetraeddikesyre

SUV - små unilamellare vesicler.

Materialer og fremgangsmåde til fremstilling af miceller

L - γ -distearoylphosphatidylcholin (DSPC) fra
5 Calbiochem og cholesterol (Chol) fra Sigma blev anvendt
uden yderligere rensning. Cholesterol-oleat [Oleat-1- ^{14}C](specifik aktivitet 51 Ci/mol) og ^{14}C -ethylendia-
min-tetraeddikesyre [eddikesyre 2- ^{14}C] (EDTA; specifik
aktivitet 4,38 mCi/mmol) blev indkøbt fra New England
10 Nuclear. Natriumsalt af nitril-eddikesyre (NTA) og EDTA
blev indkøbt fra Baker Chemical Company. Strålingskemi-
kaliet $^{111}\text{InCl}_3$ (forskningskvalitet) blev indkøbt fra
Medi-Physic og anvendt uden rensning. Ionophon A23187
blev indkøbt fra Calbiochem. Agarose (type IX) blev op-
15 nået fra Sigma, og gelatine (Knox-gelatine) blev købt
kommercielt. Agarose er den naturlige geldannende frak-
tion af polysaccharid-komplekset agar, som ekstraheres
fra agarocytter af algae, hørende til Rhodophyceae, medens
gelatine er en heterogen blanding af vandopløselige,
20 højmolekylære proteiner afledt fra collagen. BDFlmus
blev leveret fra Simonson Laboratories (Gilroy, CA).

Fremstilling og "Loading" af vesicler

Små unilamellare vesicler blev fremstillet og
25 loaded efter den metode, som beskrives af Mauk M.R. &
Gamble R.C., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 76, 765 (1979).
Dette vil i korte træk sige, at en lipidblanding blev
fremstillet ved at blande DSPC, Chol, og A23187 i mol-
forholdet 2:1:0,004. Lipidblandingen blev tørret i va-
30 kuum natten over og derpå behandlet med ultralyd i salt-
vand med phosphatstødpude (PBS, pH 7,4), indeholdende
1mM NTA eller som iøvrigt specificeret. ^{14}C eller ^3H
cholesterololeat blev medtaget som markør for lipidfa-
sen. Efter ultralydsbehandling, annealing, og centrifu-
35 gering ved lav hastighed, blev vesiclerne adskilt fra
overskydende NTA ved passage over en Sephadex G-50 ko-
lonne, som var bragt i ligevægt med PBS.

Vesicler blev loaded med $^{111}\text{InCl}_3$ ved tilsætning af radionuclidet til vesicelpræparatet, og inkubering ved 80°C i 45 minutter. Efter inkubering blev overskydende EDTA sat til komplekset med fri ^{111}In på overfladen af vesiclen eller i opløsningen. Frit ^{111}In -EDTA-kompleks blev derpå adskilt fra loaded vesicler ved søjlekromatografi under anvendelse af Sephadex G-50.

Målinger af dynamisk lysspredning

Vesicelstørrelsen blev målt ved dynamisk lysspredning, som er baseret på den tidsmæssige opførsel af svingningerne med hensyn til spredningsintensitet, Frokjaer S., et al., Alfred Benzon Symp., 17, 384 (1982). Efterhånden som partiklerne undergår fortsat Brownsk bevægelse, vil spredningsintensiteten undergå store variationer fra nul (totalt destruktiv interferens) til en maksimumsværdi (ingen interferens). Diffusionskoefficienten af de diffunderende partikler er relateret til den gennemsnitlige varighed af ændringerne i intensiteten af det spredte lys. Almindeligt gælder, at jo større partiklerne er, jo langsommere vil diffusionen være, og jo længere er gennemsnitstiden for ændringerne. For kugleformede partikler (såsom liposomer) er diffusionskoefficienten (D) knyttet til den hydrodynamiske radius (r_h) ved Stokes-Einstein-ligningen: $D = k_B T / 6 \eta_0 r_h$, hvor k_B er Boltzman's konstant, T er den absolutte temperatur, og η_0 er opløsningsmidlets viskositet.

En fortyndet prøve af vesicelsuspensionen i filtreret PBS blev fremstillet i rene 6 x 50 mm prøverør. Lysspredningsmålinger blev udført med en NiComp partikelmålermodel TC-200 med beregnende autocorrelator. Instrumentet er forsynet med en 64 kanals 4-bit autocorrelator og en 5 mW He-Ne laser med lav støj.

Eksempel I

Små unilamellare vesicler (SUV), som udgjordes af DSPC og Chol i molforholdet 2 til 1, blev fremstillet efter den beskrevne metode. ^{14}C -Cholesterololeat blev
5 inkluderet som lipidmarkør. Efter behandling med ultralyd, annealing, og centrifugering ved lav hastighed, blev vesiclerne blandet med enten gelatine eller agarose i en steriliseret flaske til en slutkoncentration på (1) 10 mg SUV pr. ml 1%'s gelatineopløsning, (2) 35 mg SUV
10 pr. ml 1%'s gelatineopløsning eller (3) 10 mg SUV pr. ml 1%'s agaroseopløsning. Alle flaskerne blev derpå henstillet i et køleskab ved 4°C . På forskellige tidspunkter efter fremstillingen blev prøver af vesicler med forskellig koncentration eller forskelligt polymermedium
15 smeltet ved stuetemperatur. Fortyndede prøver af disse vesicler i PBS blev fremstillet, og størrelsen blev målt ved laserlys-spredning, som beskrevet ovenfor. Som det fremgår af tegningen, forblev størrelsen uændret, når vesiclerne blev opbevaret enten i gelatine- eller agarosematricen.
20 I modsætning hertil skete der en sammenklumpning og forening af vesiclerne i PBS i løbet af kort tid efter fremstillingen.

25

Eksempel II

I det foregående eksempel blev det vist, at vesiclernes størrelse forbliver uændret i lang tid i en polymermatrix. Det er imidlertid også meget vigtigt, set fra et farmakologisk synspunkt, at liposomerne be-
30 varer det materiale, de har indesluttet inde i vesiclen under en rimelig lang opbevaringstid. Dette eksempel viser, at der ikke sker nogen udstrømning af indesluttet materiale fra vesicler i et 1%'s gelatinemedium ved 4°C .

1 mM ^{14}C -EDTA i PBS blev ultralydbehandlet med
35 DSPC og Chol (2:1), som var mærket med en spormængde ^3H -

cholesterololeat. Den fri ikke-indkapslede EDTA blev fraskilt fra det indesluttede materiale ved passage gennem en Sephadex G-50 kolonne. SUV, som havde indesluttet ^{14}C -EDTA blev derpå blandet med gelatine til en slutkoncentration på 10 mg/ml i en 1% 's gelatineopløsning, som blev henstillet ved 4°C. Udstrømning af indesluttet EDTA som funktion af tiden, kan bestemmes ud fra formindskelsen af forholdet mellem ^{14}C og ^3H . Som vist i tabel I forbliver ikke alene kun størrelsen af vesiclerne uændret, men materialet inde i vesicelstrukturen forbliver indesluttet under opbevaringen.

T A B E L I

15 Stabiliseringsvirkning af gelatine på størrelsen og på indkapslet materiale i vesiclerne

	<u>Døgn efter fremstilling</u>	<u>Størrelse Å</u>	<u>$^{14}\text{C}/^3\text{H}$</u>
20	0	867	0,143
	3	888	0,154
	7	888	0,147
	9	880	0,157
	43	881	0,157

25

Eksempel III

Til yderligere illustrering af de fysiske egenskaber af vesicler efter lagring, blev vesicler, som havde været opbevaret i gelmatrix forsynet med radioaktivt ^{111}In . Der blev anvendt et γ -strålings"perturbed angular coincidence"-spektrometer (PAC) til måling af i hvor høj grad vesiclerne var intakte efter at være forsynet med det radioaktive stof, Kwang K.J. & Mauk M.R., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA., 74, 4991 (1977); og Meares C.F. & Westmoreland D.G., Cold Spring Harbor Symp.

35

Quart. Biol., 36, 511 (1971). Spektrometret måler rotationskorrelationstiden for ^{111}In , hvilken korrelations-
 tid er relateret til radionucleidets "tumbling rate".
 Når ^{111}In er indkapslet i vesiclerne, har det en stor
 5 "tumbling rate" (G_{22}) som følge af dets binding til den
 lille chelator inden i vesiclen. Når vesiclen imidler-
 tid er beskadiget (f.eks. ved beskadigelse ved tilsæt-
 ning af isopropanol) eller det indesluttede materiale
 siver ud fra vesiclen af andre årsager, bindes det til
 10 protein, som måtte være til stede i omgivelserne, hvil-
 ket i høj grad nedsætter "tumbling rate". Det fremgår
 af nedenstående resultater, at vesicler af DSPC og Chol
 (2:1), som har været opbevaret i henholdsvis 1 og i 20
 døgn i 1% gel ved 4°C , har egenskaber, som kan sammen-
 15 lignedes med friskt fremstillede vesicler efter indførelse
 af ^{111}In . G_{22} forbliver den samme med og uden serum,
 hvilket indicerer, at langvarig opbevaring ikke har ska-
 delig virkning på vesiclernes membran.

20 T A B E L II (G_{22})

	1 døgn gamle	20 døgn gamle	friskt
	vesicler op-	vesicler op-	fremstil-
	bevaret i 1%	bevaret i 1%	let vesic-
25	gel ved 4°C	gel ved 4°C	ler
Vesicel + PBS	0,44	0,46	0,45
Vesicel + serum	0,48	0,46	0,44
Vesicel + serum			
30 + isopropanol	0,1	0,06	0,09

Eksempel IV

For at vise betydningen af opretholdelse af ve-
 35 sikelstørrelse blev biofordelingen af disse lagrede ve-
 sicler undersøgt i mus med tumor. DSPC, Chol (2:1) ve-

sicler, indkapslet med et 1mM NTA blev opbevaret i en 1%'s gelatineopløsning ved 4°C. På bestemte tidspunkter efter fremstillingen blev gelmatrixen smeltet ved stuetemperatur. Vesiclerne, som var suspenderet i denne vandige opløsning blev derpå forsynet med radioaktiv komponent som beskrevet ovenfor. Derefter blev 1 mg af disse vesicler injiceret intravenøst i BDF1-mus med en 6-8 døgn gammel Lewis lungcarcinoma. Musene blev derpå aflivet 24 timer efter injektion. Ved γ -tælling blev biofordelingen af de injicerede vesicler beregnet som mængden af radioaktivitet pr. g væv. Biofordelingen af disse lagrede vesicler blev sammenlignet med biofordelingen af friskt fremstillede vesicler i samme stamme af mus. Ingen signifikant forskel (Student t test, p 0,001) blev fundet mellem friskt fremstillede vesicler og vesicler i gelatine, som det fremgår af tabel III.

T A B E L III

Biofordeling af In-NTA indkapslede vesicler i tumormus.

<u>Døgn efter fremstilling</u>	<u>% injiceret dosis/g væv</u>			
	<u>Tumor</u>	<u>Lunge</u>	<u>Lever</u>	<u>Milt</u> <u>Nyre</u>
0 (uden gelatine)	19,62±4,41	14,01±2,81	31,38±5,58	15,52±5,67 14,78±0,41
7	21,58±2,57	16,31±3,36	36,77±6,06	19,32±1,52 15,67±2,24
28	27,62±2,04	14,36±6,82	34,56±2,13	21,88±2,57 13,88±0,55
50	23,17±5,09	17,25±4,47	32,72±1,63	23,35±1,64 14,29±0,64

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan der som gelmatrix anvendes et vilkårligt af et antal polymere materialer omfattende naturlige og syntetiske materialer. Som eksempler kan nævnes polysaccharider, såsom gummi arabicum, ethylcellulose, hydrolyseret stivelse og natriumalginat, polypeptider og polyestre syntetiseret ud fra lactid eller syre, poly(β -hydroxybutyrat), poly-(DL-lactid-co-glycolid). I de foregående eksempler eksemplificerer agarose egnede polysaccharider, medens gelatine eksemplificerer egnede polypeptider. Andre polymere gelmaterialer kan anvendes, når blot det specielle materiale er i stand til at danne den ønskede beskyttende geloverflade rundt om de micellulære partikler ved lave temperaturer og omdannes til en væske, f.eks. ved smeltning ved temperaturer nær stuetemperatur eller ved højere temperaturer til dannelselse af en vandig suspension. Selv om anvendelse af en gelmatrix, som er i stand til en sådan transformation ved smeltning foretrækkes, vil det være klart, at sådanne materialer, som er i stand til at undergå den nævnte transformation ved hjælp af andre foranstaltninger, f.eks. ved enzymatisk virkning, også kan anvendes.

Selv om mængden af gel i opløsningen eller matrixen er mindre afgørende for opnåelse af den ønskede stabilisering af partiklerne, er den i høj grad bestemmende for den temperatur, ved hvilken gelmatrixen dannes. Således vil f.eks. en gelopløsning med ca. 1% gelindhold størkne ved ca. 4°C, medens en 10%'s gelopløsning størkner ved ca. stuetemperatur. Ud fra sådanne overvejelser vil gelmatrixen typisk være en opløsning af fra ca. 0,5 vægt% til ca. 10 vægt% gel, idet 1-5 vægt% udgør det foretrukne område.

Som nævnt ovenfor kan et vilkårligt blandt flere terapeutiske midler indesluttet i de micellulære partikler. Som eksempler på terapeutiske midler kan nævnes antibiotika, stofskifteregulatorer, immunmodulatorer.

rer, chemoterapeutiske lægemidler, toxinantistoffer etc. Tilsvarrede kan partiklerne lades med ^{111}In eller andre diagnostiske radionuclider, f.eks. andre γ -strålingsafgivere såsom Ga-67, Tc-99M, Cr-51, I-125 etc., og fluorescerende materialer eller andre materialer, der kan påvises ved in vitro anvendelser.

Fra ovenstående eksempler fremgår, at der ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen opnås stabilisering af miscellulære partikler ved opbevaring i lange tidsrum. Ved at suspendere partiklerne i en polymer gelmatrix til dannelsen af en beskyttende geloverflade rundt om partiklerne, undgås sammenklumpning eller sammensmeltning af partiklerne, uden at vesiclernes anvendelsesmuligheder begrænses, eller at der sker udstrømning af indesluttet materiale.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til opbevaring af phospholipid liposomer, k e n d e t e g n e t ved, at man suspenderer liposomerne i en farmaceutisk acceptabel polymer gelopløsning til dannelsen af en suspension med en beskyttende geloverflade rundt om liposomerne og afkøler suspensionen til dannelsen af en gelmatrix som begrænser bevægelsen af liposomerne; opvarmer gelmatrixen til mindst ca. stuetemperatur, hvorved gelmatrixen omdannes til en vandig suspension egnet til anvendelse.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at gelmatrixen er polysaccharid eller peptid.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at gelmatrixen er gelatine eller agarose.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at et terapeutisk virkende middel er indesluttet i phospholipid liposomerne.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at gelmatrixen er en opløsning, indeholdende fra ca. 0,5 til ca. 10 vægt% gel.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g -
n e t ved, at gelmatrixen indeholder fra ca. 1 til ca.
5 vægt% gel.

