



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 339 T2** 2007.11.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 011 637 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 9/127** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 339.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/18739**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 945 975.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/012523**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.09.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **18.03.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **14.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.11.2007**

(30) Unionspriorität:  
**925532**                      **08.09.1997**                      **US**

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

(73) Patentinhaber:  
**SkyePharma Inc., San Diego, Calif., US**

(72) Erfinder:  
**YE, Qiang, San Diego, CA 92129, US; KATRE,  
Nandini, Solana Beach, CA 92075, US;  
SANKARAM, Mantripragada, San Diego, CA  
92130, US**

(74) Vertreter:  
**Stenger, Watzke & Ring Patentanwälte, 40547  
Düsseldorf**

(54) Bezeichnung: **Veränderung der Wirkstoffladung in multivesikulären Liposomen**

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**

## Hintergrund der Erfindung

## 1. Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Steuern des Ladens eines aktiven Wirkstoffs in Liposomen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zum Modulieren des Ladens von aktiven Wirkstoffen in multivesikuläre Liposome.

## 2. Beschreibung des Standes der Technik

**[0002]** Die optimale Behandlung mit vielen Arzneimitteln erfordert, dass die Arzneimittelkonzentration auf einem spezifischen Niveau für eine anhaltende Zeitperiode gehalten wird. Zum Beispiel erfordert die optimale Antikrebs-Behandlung mit Zellzyklus-spezifischen Antimetaboliten die Aufrechterhaltung einer zytotoxischen Arzneimittelkonzentration für eine anhaltende Zeitperiode. Cytarabin ist ein äußerst Zeitplan-abhängiges Antikrebs-Arzneimittel. Da dieses Arzneimittel Zellen nur abtötet, wenn diese DNA synthetisieren, ist eine anhaltende Exposition bei einer therapeutischen Konzentration des Arzneimittels für eine optimale therapeutische Wirkung erforderlich. Die therapeutische Wirksamkeit von solchen Wirkstoffen wird häufig durch die Tatsache verkompliziert, dass die Halbwertszeit nach einer intravenösen oder subkutanen Dosis so kurz wie einige wenige Stunden ist. Um eine optimale therapeutische Wirkung gegen Krebszellen mit einem Zellzyklusphasen-spezifischen Arzneimittel, wie Cytarabin, zu erreichen, gibt es zwei Hauptanforderungen: erstens müssen die Krebszellen einer hohen Arzneimittelkonzentration ausgesetzt werden, ohne den Wirt signifikant irreversibel zu schädigen; und zweitens muss der Tumor zu dem Arzneimittel für eine anhaltende Zeitperiode ausgesetzt werden, um die Anzahl der Krebszellen zu maximieren, die während der DNA Synthese, dem anfälligen Teil des Zyklus der Zellproliferation, kontaktiert werden. Diese Art von Behandlungsplan erfordert eine hohe Arzneimittelbeladung in einer Formulierung mit verzögerter Freisetzung.

**[0003]** Bestimmte andere Arten von Arzneimitteln sind so toxisch, dass es wichtig ist, eine niedrigere Arzneimittelkonzentration über eine verlängerte Zeitperiode aufrechtzuerhalten. Zum Beispiel ist Amikacin ein Aminoglycosid-Antibiotika mit einer klinisch-signifikanten Aktivität gegen sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterienstämme. Bei existierenden therapeutischen Prozeduren wird das Arzneimittel durch intravenöse oder intramuskuläre Weg mit einem einmal- oder zweimal am Tag-Zeitplan verabreicht. Die am häufigsten verwendete klinische Dosis ist 15 mg/kg/Tag, welche äquivalent ist zu einer maximal empfohlenen täglichen Dosis von 1 g pro Tag. Die Verabreichung des Arzneimittels durch beabstandete Injektionen führt jedoch zu der systemischen Exposition des Patienten, und abhängig von dem Arzneimittel, erhöht das Risiko von toxischen Nebenwirkungen. Folglich wäre eine lokale Depot-Zubereitung mit langsamer Freisetzung für die Behandlung von Infektionen, wie jene, die auf eine lokale Region von Weichgewebe oder Knochen vorteilhaft ist, beim Erhöhen der lokalen Gewebekonzentrationen des Arzneimittels vorteilhaft, im Vergleich mit therapeutischen systemischen Dosen, indem die systemische Toxizität des freien Arzneimittels reduziert oder vermieden wird. Wenn das Arzneimittel äußerst toxisch ist oder der Behandlungsplan eine niedrigere therapeutische Dosis erfordert, ist eine relativ geringe Arzneimittelbeladung in einer Formulierung mit langsamer Freisetzung vorteilhaft.

**[0004]** Ein Ansatz, welcher verwendet wurde, um Zusammensetzungen mit kontrollierter Freisetzung für die Arzneimittelabgabe bereitzustellen, ist die Liposomeneinkapselung. Unter den Haupttypen von Liposomen sind multivesikuläre Liposomen (Kim, et al., *Biochim. Biophys. Acta*; 728: 339–348, 1983) eindeutig verschieden von unilamellaren Liposomen (Huang, *Biochemistry*; 8: 334–352, 1969; Kim et al., *Biochim. Biophys. Acta*; 646: 1–10, 1981), multilamellaren Liposomen (Bangham, et al., *J. Mol. Bio.*, 13: 238–252, 1965), und stabilen plurilamellaren Liposomen (U.S. Patent Nr. 4.522.803). Im Gegensatz zu unilamellaren Liposomen, enthalten multivesikuläre Liposome mehrere wässrige Kammern. Im Gegensatz zu multilamellaren Liposomen sind die mehreren wässrigen Kammern von multivesikulären Liposomen nicht konzentrisch.

**[0005]** Der Stand der Technik beschreibt Verfahren zum Herstellen von multivesikulären Liposomen (Kim et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 728: 339–348, 1983). Die Einkapselungswirksamkeit von einigen kleinen Molekülen, wie Cytosinarabinosid, auch als Cytarabin oder Ara-C bekannt, erwies sich als relativ gering, und die Freisetzungsrates von eingekapselten Molekülen in biologischen Flüssigkeiten war höher, als therapeutisch gewünscht ist. EP 0 280 503 B1 offenbart ein Verfahren, welches für das Steuern der Freisetzungsrates von eingekapselten Molekülen aus multivesikulären Liposomen entwickelt wurde, wobei ein Hydrochlorid in den Einkapselungsvorgang eingeführt wird, um die Freisetzungsrates in biologischen Fluiden (des aktiven Wirkstoffs) zu steuern. Weitere Forschung, offenbart in WO 95/13796, hat gezeigt, dass die Freisetzungsrates von Wirk-

stoffen aus multivesikulären Liposomen in menschlichem Plasma durch Einführen einer nicht-Hydrochlorid-Säure in die wässrige Lösung, in welcher der Wirkstoff aus der Bildung des multivesikulären Liposoms aufgelöst ist, gesteuert werden.

**[0006]** U.S. Patent Nr. 5.077.056 offenbart Studien, die gezeigt haben, dass die Freisetzungsrates des eingekapselten biologischen Wirkstoffs aus Liposomen in eine wässrige Umgebung durch Einführen von Protonophoren oder Ionophoren in Liposome moduliert werden können, um ein Membranpotential zu erzeugen. Zusätzlich ist ein Verfahren bekannt (U.S. Patent Nr. 5.186.941) für das Steuern der Freisetzungsrates von Arzneimitteln aus Vesikelzusammensetzungen, wobei die Liposome einen eingekapselten therapeutischen Wirkstoff enthalten, in einer Lösung, die ausreichend gelösten Stoff enthält, suspendiert werden, um eine Osmolarität bereitzustellen, die im Wesentlichen in Bezug auf die Lösung innerhalb des Vesikels isotonisch ist, und in Bezug auf die physiologische Kochsalzlösung hypertensisch ist. In multivesikulären Liposomen ist es bekannt (WO 96/08253), die Freisetzungsrates von aktiven Wirkstoffen durch Einführen eines osmotischen Spacers in die wässrige Lösung, in welcher der Wirkstoff vor der Bildung der multivesikulären Liposomen aufgelöst wird, zu steuern.

**[0007]** Zusätzlich zu den biologisch aktiven Wirkstoffen und Säuren oder osmotischen Spacern, die beabsichtigt sind, die Freisetzungsrates des biologisch aktiven Wirkstoffs aus den Liposomen zu steuern, ist es gang und gäbe, Verbindungen miteinzukapseln, die dafür bestimmt sind, um einer beliebigen einer Reihe von Helferfunktionen zu dienen. Zum Beispiel bewahren bestimmte biologisch aktive Verbindungen ihre Aktivität nur, wenn sie bei einem bestimmten pH gehalten werden. Somit werden Säuren und Puffer häufig notwendigerweise zusätzlich zu dem aktiven Wirkstoff eingekapselt, um den pH der Arzneimittel-Umgebung zu steuern. In anderen Fällen wird ein Gegenion einbezogen, um die Löslichkeit eines biologisch aktiven Wirkstoffs, der eine geringe Löslichkeit besitzt, zu erhöhen.

**[0008]** Diese Verfahren zum Erzeugen von Liposomenformulierungen mit langsamen Freisetzungseigenschaften haben sich manchmal mit dem Ziel der Herstellung von Liposomen, die eine hohe Ladung an aktiven Wirkstoff enthalten, mit guter Einkapselungswirksamkeit als inkompatibel erwiesen, so dass wenig des teuren aktiven Wirkstoffs durch Versagen des Einschließens des Wirkstoffs innerhalb der Liposome verschwendet wird.

**[0009]** Somit existiert der Bedarf an neuen Verfahren zum Herstellen von Liposomen, zum Beispiel multivesikulären Liposomen (MVLs), die die Steuerung der Arzneimittelbeladung, entweder hoch oder niedrig, ermöglichen, während die gewünschte verzögerte Freisetzung des aktiven Wirkstoffs in den Speicher und biologische Fluide aufrechterhalten wird. Von speziellem Interesse ist die Entwicklung von hochbeladenen Formulierungen mit kontrollierter Freisetzung für Peptide und Proteine. Es besteht auch ein Bedarf an neuen Verfahren zum Erreichen dieser Ziele ohne die hohe Einkapselungswirksamkeit zu opfern, um die Verschwendung von teuren aktiven Wirkstoffen, wie Arzneimittel und therapeutische Proteine, zu vermeiden.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0010]** Die vorliegende Erfindung bietet ein Verfahren zum Modulieren des Ladens eines biologisch aktiven Wirkstoffs in liposomale Formulierungen. Die Konzentration des biologisch aktiven Wirkstoffs in dem Endprodukt wird durch Einstellen der Osmolarität der wässrigen Komponente, in welcher der aktive Wirkstoff für die Einkapselung aufgelöst ist, moduliert. Eine umgekehrte Beziehung zwischen Osmolarität und Arzneimittelbeladung wurde entdeckt, wobei die Beladung mit aktivem Wirkstoff mit abnehmender Osmolarität der wässrigen Komponente zunimmt. Somit können Liposomen mit entweder hoher Arzneimittelbeladung oder geringer Arzneimittelbeladung durch Manipulation der Osmolarität der Arzneimittel-enthaltenden Lösung vor der Einkapselung erreicht werden. Es wurde außerdem entdeckt, dass die Modulation der Arzneimittelbeladung, insbesondere um eine hohe Arzneimittelbeladung zu erreichen, ohne Verlust entweder der hohen Einkapselungswirksamkeit bei dem Herstellungsverfahren oder der gewünschten kontrollierten Freisetzung des Arzneimittels aus dem verwendeten Endprodukt erreicht werden kann.

**[0011]** Durch das Verfahren dieser Erfindung hergestellte Liposome erreichen stark verbesserte Ergebnisse, in dem eine gewünschte Menge des aktiven Wirkstoffs innerhalb eines gegebenen Volumens einer injizierbaren oder implantierbaren Liposomenformulierung bereitgestellt wird und bieten eine verzögerte Freisetzung des Arzneimittels bei einer therapeutisch gewünschten Konzentration, wenn sie an einer in vivo Stelle eingeführt werden. Das gefolgte allgemeine Prinzip, um das Laden des aktiven Wirkstoffs in liposomale Formulierungen zu modulieren, wird hierin unter Bezug auf die Herstellung von multivesikulären Liposomen (MVLs) illustriert. Die Arzneimittelbeladung in Liposomen wird durch Steuern der Osmolarität der wässrigen Lösung, die

während der Herstellung der Liposome eingekapselt wird, moduliert. Osmolarität ist die Summe der molaren Konzentrationen von gelösten Stoffen, die in der wässrigen Lösung vorhanden sind, einschließlich der biologisch aktiven Substanz und jeglichen Helfermolekülen, wie die verwendeten osmotischen Exzipienten, um die Freisetzungsrates des aktiven Wirkstoffs zu verlangsamen. Wenn der gelöste Stoff in einer dissoziierten, ionisierten, oder aggregierten Form vorhanden ist, dann ist die Osmolarität als die Summe der molaren Konzentrationen der dissoziierten, ionisierten oder aggregierten Formen definiert. Der Beitrag zu der Osmolarität einer Lösung, der ein beliebiger gelöster Stoff in der Lösung ist, ist etwa äquivalent zu der Konzentration des gelösten Stoffes in der Lösung dividiert durch sein Molekulargewicht. Folglich, als ein allgemeines Prinzip, je höher das Molekulargewicht eines gelösten Stoffes, desto geringer ist die Osmolarität des gelösten Stoffes, und desto kleiner ist der Beitrag dieses gelösten Stoffes zu der Gesamtosmolarität der Lösung.

**[0012]** Es ist weithin bekannt, dass der Grad der Arzneimittelbeladung in Liposome direkt proportional zu der Konzentration des biologisch aktiven Wirkstoffs ist. Dementsprechend muss eine hohe Konzentration des aktiven Wirkstoffs in einer wässrigen Lösung, die eingekapselt wird, aufgelöst sein, um Liposome mit einem hohen Grad an Arzneimittelbeladung zu erhalten. Die Beladung kann jedoch nicht immer durch Hinzufügen einer weiteren Konzentration des aktiven Wirkstoffs erhöht werden. Gelöste Stoffe, mit Ausnahme des biologisch aktiven Wirkstoffs, die in der wässrigen Lösung vorhanden sind, die während der Herstellung der Liposomen verwendet wird, tendieren dazu, die Menge an biologisch aktiven Wirkstoff zu reduzieren, die in die Liposomen geladen werden kann. Wenn die Lösung auch osmotische Exzipienten enthält, die für das Regulieren der Löslichkeit oder Bioaktivität des aktiven Wirkstoffs notwendig sind, müssen deshalb die vorteilhaften Wirkungen der osmotischen Helferexzipienten in der Lösung gegenüber ihrer nachteiligen Wirkung bei der Arzneimittelbeladung ausbalanciert sein.

**[0013]** Um die Arzneimittelbeladung zu erhöhen, kann die Osmolarität der wässrigen Lösung verringert werden, ohne die Konzentration des darin aufgelösten aktiven Wirkstoffes zu verringern, entweder durch Reduzieren der Konzentration der osmotischen Exzipienten, oder durch Ersetzen eines osmotischen Exzipienten mit niederem Molekulargewicht durch einen osmotischen Exzipienten mit hohem Molekulargewicht mit vergleichbarer Funktion oder Beides. Wenn zum Beispiel der osmotische Exzipient ein Puffer ist, der verwendet wird, um die Löslichkeit einer bestimmten Konzentration eines biologisch aktiven Wirkstoffs zu erhalten, wird ein Puffer mit hohem Molekulargewicht ausgewählt, um eine hohe Ladung an aktivem Wirkstoff zu erhalten. Im Gegensatz dazu würde, um die Ladung in einer solchen Situation zu verringern, ein Puffer mit niederem Molekulargewicht verwendet werden.

**[0014]** Obwohl diese Prinzipien bei der Herstellung von allen Arten von Liposomen wirksam sind, werden sie hierin bei MVL Formulierungen, die derart verschiedene aktive Wirkstoffe, wie Cytarabin, Leuprolid, Enkephalin, Morphin, und Insulin-artiger Wachstumsfaktor I (IGF-1) enthalten, illustriert. Es wurde in diesen Studien gefunden, dass für eine beliebige ausgewählte Konzentration an biologisch aktiven Wirkstoff die Arzneimittelbeladung in MVLs während der Herstellung, durch Variieren der Beiträge, die die osmotischen Exzipienten in der Lösung zu der Gesamtosmolarität einer ersten wässrigen Komponente leisten, effektiv moduliert werden kann. Dieses Prinzip ist in den Beispielen hierin durch Einstellen der Konzentration eines osmotischen Modell-Exzipienten, der für gewöhnlich in liposomalen Formulierungen, entweder Saccharose oder Glycylglycin, verwendet wird, illustriert. Durch dieses Verfahren können MVL Formulierungen mit einem großen Bereich an Beladungsniveaus für einen beliebigen, gegebenen biologisch aktiven Wirkstoff hergestellt werden.

**[0015]** In dem Verfahren zum Herstellen von multivesikulären Liposomen (MVLs) mit gesteuerter Arzneimittel-Beladung, wird eine Lipidkomponente, die zumindest ein amphipathisches Lipid und ein neutrales Lipid enthält, die in einem oder mehreren organischen Lösungsmitteln aufgelöst sind, mit einer nicht mischbaren ersten wässrigen Komponente, die einen oder mehrere biologisch aktiven Wirkstoffe, die einzukapseln sind, und gegebenenfalls, einen oder mehrere osmotische Exzipienten, wie ein Helfermolekül, enthält, vermischt. Die Ladung des aktiven Wirkstoffs in der Endformulierung wird von der Gesamtosmolarität von dieser ersten wässrigen Komponente abhängen, welche die Summe der Osmolarität ist, die durch jeden der in der ersten wässrigen Komponente aufgelösten Feststoffe beigetragen wird, einschließlich dem aktiven Wirkstoff und jeglichen osmotischen Exzipienten.

**[0016]** Sobald die Osmolarität der ersten wässrigen Komponente eingestellt wurde, um die gewünschte Beladung des aktiven Wirkstoffs in dem Endprodukt zu erreichen, wird eine Wasser-in-Öl Emulsion durch Mischen der zwei miteinander nicht mischbaren Komponenten gebildet. Die Wasser-in-Öl Emulsion wird dann in eine zweite nicht-mischbare wässrige Komponente gemischt, um Lösungsmittel-Kügelchen zu bilden. Das organische Lösungsmittel wird schlussendlich von den Lösungsmittelkügelchen, zum Beispiel durch Verdampfung, entfernt, um die Aggregation dieser in MVLs zu bewirken. In dem letzten Schritt des Verfahrens werden

die MVLs in einem wässrigen Medium, wie normale Salzlösung suspendiert. Eine Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis des aktiven Wirkstoffes auf einer Gewicht zu Volumen der Formulierungsbasis enthält, kann durch Erhöhen oder Verringern des Volumens des Mediums, in welchem die MVLs, die den aktiven Wirkstoff enthalten, suspendiert sind, erhalten werden.

**[0017]** Um eine hohe Einkapselungswirksamkeit (oder prozentuelle Ausbeute) während der Formulierung der MVLs aufrechtzuerhalten und sicherzustellen, dass die Freisetzung des aktiven Wirkstoffs in Verwendung bei einer langsamen therapeutisch-wirksamen Rate erfolgt, enthält die Lipidkomponente ein oder mehrere amphipathische Lipide mit etwa 13 bis etwa 28, zum Beispiel, etwa 18 bis 22 Kohlenstoffen in seiner Kohlenstoffkette.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0018]** [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, das den Prozentsatz von IGF-1 zeigt, der in MVLs während der in vitro Inkubation (Freisetzungsrates) über 7 Tage in Plasma bei 37°C zurückgehalten wird. Während der Herstellung des Konzentrats davon wurde Saccharose oder Glycylglycin als ein osmotischer Exzipient in der wässrigen Komponente variiert, um die Arzneimittelbeladung zu steuern.  $\diamond$  = 80 mg/ml IGF-1 und 2,5 w/v% Saccharose (113,5 mOsm);  $\nabla$  = 80 mg/ml IGF-1 und 1 w/v% Glycylglycin (113,5 mOsm); + = 50 mg/ml IGF-1 und 1 w/v% Saccharose (63,5 mOsm). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

**[0019]** [Fig. 2](#) ist ein Diagramm, das die IGF-I Konzentration über 8 Tage in Serum (ng/ml) von männlichen Ratten nach einer 10 mg subkutanen Injektion von MVLs, die 80 mg/ml IGF-I und 2,5 w/v% Saccharose (113,5 mOsm) in der wässrigen Komponente enthalten, zeigt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte der Daten für drei Ratten.

#### Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

**[0020]** In dieser Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt, wobei die Menge von biologisch aktivem Wirkstoff, die pro Einheitsvolumen der Liposomenformulierung eingekapselt ist, durch Einstellen der Osmolarität der eingekapselten wässrigen Komponenten, die das Arzneimittel enthält, moduliert wird. In diesem Verfahren ergibt eine Verringerung der Osmolarität der wässrigen Komponente, in welcher der aktive Wirkstoff vor der Einkapselung aufgelöst ist, eine erhöhte Konzentration des aktiven Wirkstoffs in der endgültigen MVL Suspension auf einer Gewicht zu Volumen-Basis, und umgekehrt.

**[0021]** Es gibt zumindest drei Arten von Liposomen. Der Begriff „multivesikuläre Liposomen (MVL)“, wie in der gesamten Spezifikation und Ansprüche verwendet wird, bedeutet künstliche, mikroskopisch-flüssige Vesikel, die Lipidmembrane aufweisen, die mehrere nicht-konzentrische wässrige Kammern umhüllen. Im Gegensatz dazu weisen „multilamellare Liposomen oder Vesikel (MLV)“ mehrere „Zwiebelschalen“ konzentrische Membranen auf, zwischen welchen sich schalenartige konzentrische wässrige Kompartimente befinden sind. Multilamellare Liposomen und multivesikuläre Liposomen weisen charakteristischerweise einen nach der Länge-gewichteten mittleren Durchmesser in dem Mikrometerbereich auf, üblicherweise von 0,5 bis 25  $\mu$ m. Der Begriff „unilamellare Liposomen oder Vesikeln (ULV)“, wie hierin verwendet, betrifft liposomale Strukturen mit einer einzelnen wässrigen Kammer, üblicherweise mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von etwa 20 bis 500 nm.

**[0022]** Multilamellare und unilamellare Liposomen können durch mehrere, relativ einfache Verfahren hergestellt werden. Der Stand der Technik beschreibt eine Reihe von Techniken zum Herstellen von ULV und MLV (zum Beispiel U.S. Patent Nr. 4.522.803 an Lenk; 4.310.506. an Baldeschweiler; 4.235.871 an Papahadjopoulos; 4.224.179 an Schneider; 4.078.052 an Papahadjopoulos; 4.394.372 an Taylor 4.308.166 an Marchetti; 4.485.054 an Mezei; und 4.508.703 an Redziniak).

**[0023]** Im Gegensatz dazu erfordert die Herstellung von multivesikulären Liposomen mehrere Verfahrensschritte. In Kürze, das bevorzugte Verfahren zum Herstellen von MVL ist wie folgt: Im ersten Schritt wird eine „Wasser-in-Öl“ Emulsion durch Auflösen von zumindest einem amphipathischen Lipid und zumindest einem neutralen Lipid in einem oder mehreren flüchtigen organischen Lösungsmittel für die Lipidkomponente hergestellt. Zu der Lipidkomponente wird eine nicht-mischbare erste wässrige Komponente hinzugefügt, die einen biologisch aktiven Wirkstoff, der einzukapseln ist, und ein oder mehrere Helfermoleküle, d.h. osmotische Exzipienten, enthält, die die MVL mit nützlichen und vorteilhaften Eigenschaften versehen. Die Mischung wird emulgiert, und dann mit einer zweiten nicht-mischbaren wässrigen Komponente vermischt, um eine zweite Emulsion zu bilden. Die zweite Emulsion wird entweder mechanisch, durch Ultraschallenergie, Verdüsung, und dergleichen, oder durch Kombinationen davon gemischt, um Lösungsmittelkügelchen zu bilden, die in der

zweiten wässrigen Komponente suspendiert sind. Die Lösungsmittelkugeln enthalten mehrere wässrige Tröpfchen, wobei der biologisch aktive Wirkstoff, der einzukapseln ist, in diesen aufgelöst ist (siehe Kim et al., Biochem. Biophys. Acta, 728: 339–348, 1983). Für einen umfangreichen Überblick von verschiedenen Verfahren zur Herstellung von ULV und MLV sei auf Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 465–508, 1980 verwiesen.

**[0024]** Der Begriff „Lösungsmittelkugeln“, so wie hierin in der gesamten Spezifikation und Ansprüchen verwendet wird, bedeutet ein mikroskopisches sphärisches Tröpfchen von organischem Lösungsmittel, innerhalb dieser sind multiple kleinere Tröpfchen von wässriger Lösung. Die Lösungsmittelkugeln sind suspendiert und völlig in einer zweiten wässrigen Lösung eingetaucht.

**[0025]** Der Begriff „neutrales Lipid“ bedeutet ein Öl oder ein Fett, das selbst keine membranbildende Fähigkeit aufweist und dem eine hydrophile „Kopfgruppe“ fehlt.

**[0026]** Der Begriff „amphipathisches Lipid“ bedeutet ein Molekül, das einen hydrophile „Kopfgruppe“ und eine hydrophobe „Schwanzgruppe“ aufweist und eine membranbildende Fähigkeit besitzt.

**[0027]** Der Begriff „zwitterionisches Lipid“ bedeutet ein amphipathisches Lipid mit einer Nettoladung von Null bei pH 7,4.

**[0028]** Der Begriff „anionisches Lipid“ bedeutet ein amphipathisches Lipid mit einer negativen Nettoladung bei pH 7,4.

**[0029]** Der Begriff „kationisches Lipid“ bedeutet ein amphipathisches Lipid mit einer positiven Nettoladung bei pH 7,4.

**[0030]** Für die Herstellung von multivesikulären Liposomen ist es notwendig, dass zumindest ein amphipathisches Lipid und ein neutrales Lipid in der Lipidkomponente eingeschlossen sind. Die amphipathischen Lipide können zwitterionische, anionische oder kationische Lipide sein. Beispiele von zwitterionischen amphipathischen Lipiden sind Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Sphingomyeline etc. Beispiele von anionischen amphipathischen Lipiden sind Phosphatidylglycerole, Phosphatidylserine, Phosphatidylinositole, Phosphatidinsäuren, etc. Beispiele von kationischen amphipathischen Lipiden sind Diacyltrimethylammoniumpropan und Ethylphosphatidylcholin. Beispiele von neutralen Lipiden umfassen Diglyceride, wie Diolein, Dipalmitolein, und gemischte Caprylin-Caprin-Diglyceride; Triglyceride, wie Triolein, Tripalmitolein, Trilinolein, Tricaprylin, und Trilaurin; pflanzliche Öle, wie Sojabohnenöl; Squalen; Tocopherol; und Kombinationen davon. Zusätzlich können Cholesterol oder pflanzliche Sterole beim Herstellen von multivesikulären Liposomen verwendet werden.

**[0031]** So wie hierin verwendet, umfasst der Begriff „biologisch aktiver Wirkstoff“ oder „aktiver Wirkstoff“, wenn verwendet, um Wirkstoffe zu beschreiben, die in den Kammern des multivesikulären Liposoms oder in der wässrigen Lösung, die während der Herstellung von Liposomen verwendet wird, vorhanden sind, Wirkstoffe, die biologische Aktivität besitzen, die auf die Behandlung eines bestimmten Krankheitsstadiums abgezielt ist, entweder in der Form, die aus Vesikel freigesetzt wird, oder in einer Form, die nach der Freisetzung aus der Vesikelkammer aktiv wird. Zum Beispiel zählen zu biologisch aktiven Wirkstoffen Arzneimittel und Pro-Arzneimittel, die durch die Interaktion mit einem Enzym in einen aktiven Anteil mit therapeutischer Aktivität umgewandelt werden. Insektizide, Pestizide und Mittel mit gewünschter kosmetischer Anwendung sind ebenfalls durch den Begriff „biologisch aktiver Wirkstoff“ umfasst.

**[0032]** Der Begriff „osmotischer Exzipient“ bedeutet jedes biologisch kompatible gelöste Feststoffmolekül in einer wässrigen Lösung, das nicht der biologisch aktive Wirkstoff ist. Sowohl Elektrolyte als auch Nicht-Elektrolyte fungieren als osmotische Exzipienten. Beim Bestimmen, ob ein bestimmtes Molekül als ein osmotischer Exzipient agieren wird oder beim Bestimmen der Konzentration des osmotischen Exzipienten in einer Lösung, zum Beispiel einem, der innerhalb eines multivesikulären Liposoms eingekapselt ist, muss Rücksicht darauf genommen werden, ob, unter den Bedingungen innerhalb der Lösung (z.B. pH), das Molekül vollständig oder teilweise ionisiert ist. Es sollte auch bestimmt werden, ob solche Ionen die Lipidmembran durchdringen können (Mahendra K. Jain, van Nostrand Reinhold Co., The Biomolecular Lipid Bilayer Membrane, 1972, 470 ff). Der Fachmann wird erkennen, dass für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung der osmotische Exzipient so ausgewählt sein muss, dass jene umgangen werden, die sich für ein Lebewesen, das einer Therapie unter Verwendung von Liposomen unterzogen wird, als toxisch oder andererseits schädlich erweisen würden. Der Fachmann kann leicht die Eignung eines bestimmten osmotischen Exzipienten für die Verwendung in der vor-

liegenden Erfindung ohne Zurückgreifen auf unnötige Experimentierung evaluieren.

**[0033]** Bestimmte osmotische Exzipienten weisen eine inhärente biologische Aktivität auf, und viele fördern die biologische Aktivität des biologisch aktiven Wirkstoffs. Zum Beispiel können Kalziumionen als ein Gegenion miteingekapselt werden, um die Haltbarkeitsdauer zu erhöhen oder um die Bioverfügbarkeit eines Arzneimittels zu fördern, sie reichen jedoch nicht aus, um den therapeutischen oder andere Nutzen der MVL Formulierung zu erreichen. Zusätzlich können verschiedene Stabilisatoren vorhanden sein. Bestimmte Wirkstoffe, die häufig als Exzipienten klassifiziert sind, können sogar eine direkte biologische Aktivität besitzen, und zwar von einer sehr geringfügigen bis zu einer ganz signifikanten Aktivität. Zum Beispiel kann der gebräuchliche Exzipient Mannitol biologisch auch als ein Diuretikum wirken. Sogar Wasser kann biologisch wirken, um Dehydrierung zu heilen, wenn aber diese Verbindungen eher als osmotische Exzipienten als als aktive Wirkstoffe verwendet werden, sind sie mit anderen, die dieselbe Helferfunktion erfüllen, relativ untereinander auswechselbar. Osmotische Exzipienten, die verwendet werden können, um multivesikuläre Liposome zu bilden und um die Arzneimittelbeladung des eingekapselten Wirkstoffes von multivesikulären Liposomen zu modulieren, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Glucose, Saccharose, Trehalose, Succinat, Glycyglycin, Gluconsäure, Cyclodextrin, Arginin, Galactose, Mannose, Maltose, Mannitol, Glycin, Lysin, Citrat, Sorbitol, Dextran, und geeignete Kombinationen davon. Tabelle 1 unter vergleicht die Osmolarität von Saccharose und Glycyglycin-Lösungen bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Saccharose oder Glycyglycin (Gew./Vol.%)	Osmolarität für Saccharose (mOsm)	Osmolarität für Glycyglycin (mOsm)
0,5	15	38
1,0	30	76
1,5	45	114
2,0	60	152
2,5	76	189
3,0	91	227
4,0	123	303
5,0	156	379
6,0	190	455
7,0	225	530
8,0	261	606

<sup>1</sup> Saccharose Daten aus dem Handbook of Physics and Chemistry, 67. Ausgabe

<sup>2</sup> Glycyglycin-Daten wurden basierend auf der molaren Konzentration berechnet.

**[0034]** Fachleute können leicht verschiedene Kombinationen von Exzipienten bestimmen und vorsehen, die in den Vesikeln der Erfindung, ohne auf eine unnötige Experimentierung zurückzugreifen, benutzt werden können.

**[0035]** Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „therapeutisch wirksame Menge oder Konzentration“ die Menge eines biologisch aktiven Wirkstoffs, die notwendig ist, um eine gewünschte pharmakologische Wirkung zu induzieren. Die Menge kann stark variieren, gemäß der Wirksamkeit eines bestimmten aktiven Wirkstoffs, dem Alter, dem Gewicht und Reaktion des individuellen Wirtes, sowie der Natur und Schwere der Symptome des Wirtes. Dementsprechend gibt es keine obere oder untere kritische Beschränkung für die Menge des aktiven Wirkstoffs. Die therapeutisch wirksame Menge, die in der vorliegenden Erfindung einzusetzen ist, kann leicht durch Fachleute bestimmt werden.

**[0036]** Wie hierin verwendet, bedeutet „Arzneimittelbeladung“, in einem allgemeinen quantitativen Sinn, die Menge an biologisch aktivem Wirkstoff, die in die Produkt-Liposomen-Suspension geladen wird. Es ist deshalb ein Maß für die Menge des aktiven Wirkstoffs, die in einer Volumeneinheit der Liposomenformulierung, die an einen Patienten während der Verwendung abgegeben wird, verfügbar ist. Spezifischer bedeutet „Arzneimittelbeladung“ das Verhältnis von eingekapseltem Arzneimittel pro Volumeneinheit von Liposomensuspension zu dem Prozentsatz des eingekapselten Volumens in den Liposomen selbst. Es etwa gleich zu der Konzentration des, aktiven Wirkstoffs in der Suspension dividiert durch den Lipokrit der Suspension für das niederprozentige freie Arzneimittel:

$$\text{Arzneimittelbeladung} = \frac{[(\text{Pro Volumeneinheit der Liposomensuspension eingekapseltes Arzneimittel})]}{[(\text{Pr ozent eingekapseltes Volumen in Liposomen})]}$$

= Arzneimittelkonzentration der Liposomensuspension / Lipokrit

**[0037]** So wie hierin verwendet, bedeutet „prozentuelle Einkapselung des Arzneimittels, oder anderer Verbindung“ das Verhältnis der Menge einer einzukapselnden Verbindung in der Endsuspension des Liposomen-Herstellungsverfahrens zu der Gesamtmenge der einzukapselnden Verbindung, die in der ersten wässrigen Lösung des Prozesses verwendet wurde, multipliziert mit 100.

$$\text{Prozentuelle Einkapselung der Verbindung} = \left( \frac{[\text{Menge der eingekapselten Verbindung}]}{[\text{Menge der vor der Einkapselung eingeführten Verbindung}]} \right) \times 100$$

**[0038]** So wie hierin verwendet, bedeutet „Lipokrit“, welcher in Analogie zu Hämatokrit definiert ist, das Verhältnis des durch die Liposomen besetzten Volumens zu dem Gesamtvolumen der Suspension, multipliziert mit 100.

$$\text{Lipokrit (in Pr ozent)} = \left( \frac{[\text{Durch die Liposomen besetztes Volumen}]}{[\text{Gesamtvolumen der Liposomensuspension}]} \right) \times 100$$

**[0039]** So wie hierin verwendet, bedeutet „prozentuell freies Arzneimittel“ das Verhältnis der Menge des Arzneimittels außerhalb der Liposomen in der endgültigen Liposomensuspension, zu der Gesamtmenge an Arzneimittel in der Endsuspension (das Endprodukt), multipliziert mit 100.

$$\text{Pr ozent freies Arzneimittel} = \left( \frac{[\text{Menge des Arzneimittels außerhalb der Liposomen in dem Endprodukt}]}{[\text{Menge des Arzneimittels im Endprodukt}]} \right) \times 100$$

$$\approx (1 - \text{Lipokrit}) \times \left( \frac{[\text{Arzneimittelkonzentration außerhalb der Liposomen}]}{[\text{Arzneimittelkonzentration der Liposomensuspension}]} \right)$$

**[0040]** Die Verfahren zum Bestimmen dieser Parameter sind in Beispiel 7 dieser Anmeldung illustriert. Wo immer möglich wird die Verwendung von osmotischen Exzipienten auf ein Minimum reduziert oder vermieden, um eine hohe Beladung mit dem biologisch aktiven Wirkstoffs zu erreichen. In diesem Fall ist die Arzneimittelbeladung direkt von der Konzentration des aktiven Wirkstoffs in der einzukapselnden Lösung abhängig, da die Osmolarität größtenteils dem aktiven Wirkstoff zuschreibbar ist. Wenn es nicht möglich ist, eine erste wässrige Lösung zu verwenden, die frei von osmotischen Exzipienten ist, kann die Osmolarität der ersten wässrigen Komponente durch Austauschen von Exzipienten mit hohem Molekulargewicht gegen Exzipienten mit niederm Molekulargewicht, wie hoch molekulargewichtige Puffer oder Stabilisatoren gegen solche mit niederm Molekulargewicht, verringert werden. Auch durch Auswählen eines negativen Gegenions für ein Arzneimittel kann einen Gegenion mit hohem Molekulargewicht durch eines mit niederm Molekulargewicht ersetzt werden. Zum Beispiel in Morphinhydrochlorid kann das Chlorid-Ion durch ein Sulfat oder einem negativen Ion mit noch höherem Molekulargewicht, wie Phosphat ausgetauscht werden.

**[0041]** Falls es gewünscht ist, eine Formulierung herzustellen des biologisch aktiven Wirkstoffs mit niederer Beladung, wie wenn der biologisch aktive Wirkstoff bei hohen Konzentrationen toxisch ist, kann umgekehrt die Osmolarität der ersten wässrigen Lösung erhöht werden indem osmotische Exzipienten mit niederm Molekulargewicht ausgewählt werden, um ihre Osmolarität zu erhöhen.

**[0042]** Die untere Grenze für die Osmolarität der ersten wässrigen Komponente kann in der Nähe von Null sein, wie im Fall, wo der biologisch aktive Wirkstoff ein hoch molekulargewichtiges Protein oder anderes Makromolekül ist und keine osmotischen Exzipienten verwendet werden. Andererseits kann die Osmolarität der ersten wässrigen Komponente so hoch wie 1000 mOsm oder höher sein, ohne bei der Verwendung schädlich oder toxisch zu sein, da viele der Exzipienten während des Herstellungsverfahrens aus den Liposomen aus-

treten können. Im Allgemeinen ist die Osmolarität der ersten wässrigen Komponente jedoch im Bereich von etwa 0,01 mOsm bis etwa 1100 mOsm, zum Beispiel im Bereich von 5 mOsm bis etwa 400 mOsm.

**[0043]** Die Osmolarität der eingekapselten wässrigen Komponente in dem endgültigen liposomalen Produkt ist im Allgemeinen in Bezug auf die wässrige Umgebung isotonisch, in welcher die MVLs gelagert werden (wie 0,9 Gew.-% NaCl, oder normale Salzlösung) oder in welche die MVLs für die Verwendung eingeführt werden, wie Serum oder andere physiologisch relevante, wässrige Umgebungen. Jedoch kann die Osmolarität der wässrigen Komponente in dem endgültigen MVL Produkt hypertonisch sein, um eine optimale Abnahme der Freisetzungsrates des biologisch aktiven Wirkstoffs aus den Liposomen zu bieten. Es ist deshalb innerhalb des Umfangs dieser Erfindung vorgesehen, dass die wässrige Komponente in dem MVL Produkt hypotonisch, isotonisch oder hypertonisch in Bezug auf das Lagermedium oder die wässrige Umgebung sein kann, in welche der biologisch aktive Wirkstoff freigesetzt wird.

**[0044]** Die Osmolarität von normaler Salzlösung ist ähnlich zu jener von menschlichem Plasma und anderen in vivo Umgebungen, wie Cerebrospinalflüssigkeit, Synovialflüssigkeit, und subkutane und intramuskuläre Räume. Deshalb kann Salzlösung als ein prädiiktives Modell der MVL Arzneimittel-Freisetzung in solchen Umgebungen verwendet werden. Da die bevorzugte Verwendung der MVLs der Erfindung für die in vivo Injektion oder Implantation in Gewebe oder Körperhöhlen (z.B. als Arzneimittel-Depots) ist, werden sie üblicherweise in einem Medium, wie normaler Salzlösung, Phosphat-gepufferte Salzlösung, oder einem anderen osmotisch ähnlichen Medium gelagert.

**[0045]** Die Freisetzungsrates von aktiven Wirkstoffen aus MVLs wird im Allgemeinen durch Verringern der Osmolarität der ersten wässrigen Komponente, die während der Herstellung verwendet wird, erhöht. Die Verringerung der Osmolarität der ersten wässrigen Komponente kann jedoch eine negative Wirkung auf die verzögerte Freisetzung und Einkapselungswirksamkeit haben. Diese negative Wirkung kann durch Verwenden von einem oder mehreren amphipathischen Lipiden mit etwa 13 bis etwa 28 Kohlenstoff, zum Beispiel von etwa 18 bis 22 Kohlenstoff in der Lipidkomponente überwunden werden. Diese allgemeine Regel gilt, ob die Kohlenstoffkette des amphipathischen Lipids gesättigt ist, oder ob sie eine oder mehrere Doppelbindungen enthält. Im Allgemeinen sollte jedoch beim Auswählen der Lipide, die beim Formulieren eines multivesikulären Liposoms zu verwenden sind, beachtet werden, dass es möglich ist, ein organisches Lösungsmittel mit einem geringeren Siedepunkt zu verwenden, wenn ein Lipid mit einer gegebenen Anzahl von Kohlenstoff in der Kohlenstoffkette benutzt wird, wenn das Lipid zumindest eine Doppelbindung in der Kohlenstoffkette enthält. Die bevorzugten amphipathischen Lipide für die Verwendung beim Herstellen von multivesikulären Liposomen dieser Erfindung sind natürlich vorkommende Lipide. Die vorteilhaften Wirkungen auf die Einkapselungswirksamkeit und verzögerte Freisetzung des biologisch aktiven Wirkstoffs, die durch Benutzen solcher langkettiger amphipathischer Lipide während der Herstellung von MVLs zu erhalten sind, sind im gleichzeitig anhängenden U.S. Patent Anmeldeungs Nr. 08/723.583, eingereicht am 1. Oktober, 1996, mit dem Titel „Methods for Producing Liposomes With Increased Percent of Compound Encapsulated“, die hierin zur Gänze durch Bezugnahme aufgenommen ist, offenbart.

**[0046]** Eine repräsentative Liste von langkettigen amphipathischen Lipiden, die beim Ausführen dieser Erfindung nützlich sind, folgt. Diese Liste ist illustrativ und nicht beabsichtigt, den Umfang der Erfindung auf irgendeine Weise zu beschränken. Ebenfalls eingeschlossen sind die Abkürzungen, die verwendet werden, um die Phospholipide in dieser Anmeldung und in der wissenschaftlichen Literatur zu bezeichnen.

DOPC oder DC18:1PC = 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DLPC oder DC12:0PC = 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DMPC oder DC14:0PC = 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DPPC oder DC16:0PC = 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DSPC oder DC18:0PC = 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DAPC oder DC20:0PC = 1,2-Diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DBPC oder DC22:0PC = 1,2-Dibehenoyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DC16:1PC = 1,2-Dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DC20:1PC = 1,2-Dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DC22:1PC = 1,2-Dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholin  
 DPPG = 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol  
 DOPG = 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol

**[0047]** Viele unterschiedliche Arten von flüchtigen hydrophoben Lösungsmitteln, wie Ether, Kohlenwasserstoffe, halogenierte Kohlenwasserstoffe, superkritische Fluide, einschließlich, ohne darauf beschränkt zu sein, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, und Freone, können als das Lipidphasen-Lösungsmittel verwendet werden. Zum Beispiel sind Diet-

hylether, Isopropyl und andere Ether, Dichlormethan, Chloroform, Tetrahydrofuran, halogenierte Ether, Ester und Kombinationen davon zufriedenstellend.

**[0048]** Therapeutische biologisch aktive Verbindungen, oder Arzneimittel, für die Einkapselung in den Verfahren und Zusammensetzungen dieser Erfindung können aus der allgemeinen Gruppe bestehend aus anti-neoplastischen Mitteln, antiinfektiöse Mittel, Hormone, Antidepressiva, entzündungshemmende Wirkstoffe, antivirale Wirkstoffe, antinociceptive Wirkstoffe, Anxiolytika und Biologika.

**[0049]** Zu repräsentativen Beispielen von antineoplastischen Wirkstoffen, die in den Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung nützlich sind, zählen Methotrexat, Taxol, Tumornekrosefaktor, Chlorambucil, Interleukine, Etoposid, Cytarabin, Fluoruracil und Vinblastin.

**[0050]** Zu repräsentativen Beispielen von antiinfektiösen Wirkstoffen, die in den Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung nützlich sind, zählen Amikacin, Pentamidin, Metronidazol, Penicillin, Cephalixin, Tetracyclin, und Chloramphenicol.

**[0051]** Zu repräsentativen Beispielen von antiviralen Wirkstoffen, die in den Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung nützlich sind, zählen Dideoxycytidin, Zidovudin, Acyclovir, Interferone, Dideoxyinosin, und Ganciclovir.

**[0052]** Zu repräsentativen Beispielen von Anxiolytika und Sedativa, die in den Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung nützlich sind, zählen Benzodiazepine, wie Diazepam, Barbiturate, wie Phenobarbital, und andere Verbindungen, wie Buspiron und Haloperidol.

**[0053]** Zu repräsentativen Beispielen von Hormonen, die in den Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung nützlich sind, zählen Estradiol, Prednison, Insulin, Wachstumshormon, Erythropoietin, und Prostaglandine.

**[0054]** Zu repräsentativen Beispielen von Antidepressive, die in den Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung nützlich sind, zählen Fluoxetin, Trazodon, Imipramin, und Doxepin.

**[0055]** Zu repräsentativen Beispielen von Antinociceptiva, die in den Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung nützlich sind, zählen Bupivacain, Hydromorphin, Oxycodon, Fentanyl, Morphin und Meperidin.

**[0056]** Der Begriff „Biologika“ umfasst Nucleinsäuren (DNA und RNA), Glucosaminoglykane; Protein und Peptide, und umfasst Verbindungen, wie Cytokine, Hormone (hypophysäre, adrenale, und pituitäre Hormone), Wachstumsfaktoren, Vakzine etc. Von besonderem Interesse sind Interleukin-2, Insulinartiger Wachstumsfaktor-1 (IGF-1), Interferone, Insulin, Heparin, Leuprolid, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Tumornekrosefaktor, Inhibin, Tumorstromafaktor Alpha und Beta, Mullerian initiiierende Substanz, Calcitonin, Hepatitis B Vakzin, DNA oder RNA Vakzine, DNA für Gentransfer, und Antisense-Oligonukleotide.

**[0057]** Der biologisch aktive Wirkstoff kann in der vorliegenden Erfindung in verschiedenen Formen eingesetzt werden, wie molekulare Komplexe oder biologisch akzeptable Salze. Repräsentative Beispiele von solchen Salzen sind Succinat, Hydrochlorid, Hydrobromid, Sulfat, Phosphat, Nitrat, Citrat, Glucuronat, Borat, Acetat, Maleat, Tartrat, Salicylat, Metallsalze (z.B. Alkali oder Erdalkali), Ammonium oder Aminalsalze (z.B. quaternäres Ammonium) und dergleichen. Weiters können Derivate der aktiven Wirkstoffe, wie Ester, Amide, und Ethers davon, die die gewünschten Retentions- und Freisetzungseigenschaften besitzen, die jedoch bei physiologischem pH oder durch Enzyme leicht in vivo hydrolysiert werden, ebenfalls als der biologisch aktive Wirkstoff eingesetzt werden.

**[0058]** Die Konzentration des eingekapselten biologisch aktiven Wirkstoffs kann von etwa einigen Picomol bis zu mehreren Hundert Millimol variieren. Die gewünschte Konzentration des biologisch aktiven Wirkstoffs wird in Abhängigkeit solcher Eigenschaften, wie der zu behandelnden Krankheit, dem Alter und Zustand des Patienten, und den besonderen Eigenschaften des Wirkstoffs variieren. Im Fall wo der Wirkstoff normalerweise mit Nebenwirkungen, wie Toxizität assoziiert ist, ist es im Allgemeinen wünschenswert, ein MVL mit geringerer Wirkstoffkonzentration zu erzeugen und benutzt eine höhere Konzentration an osmotischen Exzipienten. Der Zusammenhang dieser verschiedenen Parameter kann leicht durch einen Fachmann beim Auswählen und Erzeugen einer bestimmten MVL Zusammensetzung, ohne auf unnötige Experimentierung zurückgreifen zu

müssen, evaluiert werden.

**[0059]** Formulierungen mit hoher Beladung, die durch das Verfahren dieser Erfindung erhalten wurden, sind besonders in der pharmazeutischen Industrie für das Reduzieren der Menge an Liposomen-Formulierung, die einem Lebewesen verabreicht werden muss (d.h. intramuskulär oder subkutan), nützlich, um eine gewünschte therapeutische Konzentration des Arzneimittels im Blutstrom zu erreichen. Die obere nützliche Grenze der Menge an Arzneimittel, die in ein gegebenes Volumen von Liposomensuspension eingekapselt ist, kann jedoch durch den Lipokrit der Suspension diktiert werden. Der Fachmann wird erkennen, dass es schwierig sein kann, eine Liposomen enthaltende Suspension zu injizieren, wenn der Lipokrit der Suspension zu hoch ist.

**[0060]** Der für die in vivo Verwendung in Menschen geeignete Dosierungsbereich des biologisch aktiven Wirkstoffs in multivesikulären Liposomen dieser Erfindung umfassen den Bereich von 0,001–6,000 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Während Dosen außerhalb des vorangehenden Dosisbereichs gegeben werden können, umfasst dieser Bereich die Breite der Verwendung für praktisch alle der biologisch aktiven Wirkstoffe. Für einen bestimmten therapeutischen Wirkstoff kann jedoch die bevorzugte Konzentration leicht, wie zuvor beschrieben ist, bestimmt werden.

**[0061]** Die MVL Formulierungen können weiters verdünnt werden, um eine injizierbare Depotformulierung mit verzögerter Freisetzung von einer beliebigen therapeutisch wirksamen Gesamtdosierung durch Hinzufügen eines Suspendiermediums oder eines physiologisch akzeptablen Trägers erreicht werden. Zu gebräuchlichen geeigneten Trägern zählen wässrige oder nichtwässrige Lösungen, Suspensionen, und Emulsionen. Beispiele von nicht-wässrigen Lösungen sind Propylenglycol, Polyethylenglycol, pflanzliche Öle, wie Olivenöl, und injizierbare organische Ester, wie Ethyloleat. Wässrige Träger umfassen Wasser, alkoholische-wässrige Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen, einschließlich Salzlösung und gepufferte Medien. Parenterale Vehikel umfassen Natriumchlorid-Lösung, Ringer's Dextrose, Dextrose, und Ringer-Lactat-Lösung. Intravenöse Vehikel umfassen Fluid und Nährstoff-Replenisher, Elektrolyt-Replenisher (wie jene, die auf der Ringer's Dextrose basieren), und dergleichen. Konservierungsmittel und andere Zusätze können auch vorhanden sein, wie antimikrobielle Substantzen, Antioxidantien, Chelatbildner, und inerte Gase (siehe Remington's Pharmaceutical Science, 16. Ausgabe, A. Oslo, Hrsg., Mack, Easton, PA. 1980).

**[0062]** Die multivesikulären Liposome können durch jede geeignete Route verabreicht werden: zum Beispiel intratumoral, intra-artikulär (in Gelenke), intraokular, intramuskulär, intrathecal, intraperitoneal, subkutan, intravenös, intralymphatisch, oral und submukosal. Die multivesikulären Liposome können unter Verwendung von Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, modifiziert werden, indem daran, entweder direkt von indirekt, mit Hilfe eines Exzipienten-Moleküls oder Peptids Ziel-spezifische Liganden, wie Antikörper und andere Rezeptor-spezifische Proteinliganden angeheftet werden, um eine Organ- oder Zielzell-Spezifität zu vermitteln (Malone, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., U.S.A., 86: 6077, 1989; Gregoriadis, Immunology Today, 11(3): 89, 1990; beide sind durch Bezugnahme hierin aufgenommen).

**[0063]** Eine Reihe von Experimenten wurde ausgeführt, um zu zeigen, dass die Wirkung der Osmolarität auf die Arzneimittelbeladung invertiert ist und von anderen Parametern, die während des Herstellungsverfahrens verwendet werden, abhängig ist, mit Ausnahme der Menge des aktiven Wirkstoffs, welche direkt proportional zu der Menge an aktiven Wirkstoff ist, die in eine liposomale Formulierung geladen werden kann. Diese zwei Parameter müssen deshalb balanciert sein, um den gewünschten Grad an Beladung zu erhalten. Zum Beispiel wurde in Beispiel 1 gezeigt, dass Cytarabin in MVLs unter Verwendung eines Vortex-Mischers und einer ersten wässrigen Komponente, die 40 mg/ml Cytarabin in 20 mM Zitronensäure und Mengen an Saccharose im Bereich von Null bis 8,0 Gewicht/Volumen-Prozent (Gew./Vol.-%) enthält, eingekapselt werden kann. Die entsprechend geschätzte Osmolarität der ersten wässrigen Zusammensetzung in diesem Bereich von Formulierungen war 185.9 bis 446.9 mOsm. Der entsprechende Bereich der Arzneimittel-Beladung (Tabelle 2) war von 61,7 bis 21,0 mg/ml, wobei die % Ausbeute des Einkapselungsvorgangs relativ konstant bleibt.

**[0064]** Durch Variieren der Konzentration des aktiven Wirkstoffs und der Konzentration des osmotischen Exzipienten ergibt die Erfindung MVL Formulierungen mit einem weiten Bereich an Arzneimittelbeladung für einen bestimmten aktiven Wirkstoff. In Beispiel 2 zum Beispiel wurde Met-Enkephalin in MVLs unter Verwendung einer ersten wässrigen Komponente, die 40 oder 5 mg/mL Met-Enkephalin in 20 mM Zitronensäure, und 0, 2,5 oder 5 Gew.-/Vol.-% Saccharose enthält, eingekapselt, was einen Osmolaritätsbereich der ersten wässrigen Komponente von 35,5 bis 191,5 mOsm erzeugt. Die Ergebnisse dieser Studien (Tabellen 2 und 3) zeigen, dass das Verringern der Osmolarität in der ersten wässrigen Komponente zu einer proportionalen Zunahme in der Arzneimittel-Beladung führte, ob die Menge an aktiven Wirkstoff in der ersten wässrigen Lösung 40 mg/ml oder 5 mg/ml war. Zusätzlich wurden MVL Formulierungen, die so wenig wie 6,4 mg/mL oder so viel wie 61,7 mg/mL

Arzneimittel enthielten, unter Verwendung des Verfahrens der Erfindung erhalten. Diese Ergebnisse illustrieren die breite Anwendbarkeit des Prinzips, das der beanspruchten Erfindung zugrunde liegt.

**[0065]** Weitere Studien wurden ausgeführt unter Verwendung von IGF-1 Konzentrationen in der ersten wässrigen Komponente im Bereich von 10 bis 80 mg/ml, entweder mit oder ohne 100 mM HCl oder 25 mM Zitronensäure bei konstantem pH. Es wurde gefunden, dass die Löslichkeit und Bioverfügbarkeit von eingekapseltem IGF-I entsprechend dem pH der ersten wässrigen Komponente variiert. Studien haben gezeigt, dass bis zu etwa 300 mg/mL IGF-I ist bei einem pH unter 5 löslich sind. Für alle getesteten IGF-I Konzentrationen variierte die Arzneimittelbeladung, im pH Bereich, indem das Arzneimittel löslich ist, entsprechend der Osmolarität. Für IGF-1 Konzentrationen im Bereich von 40 bis 300 mg/ml war die Löslichkeit im Bereich von 2 bis 4,8 am größten; während der nützliche Löslichkeitsbereich für IGF-I Konzentrationen im Bereich von etwa 1 mg/ml bis etwa 33 mg/ml von etwa 1 bis etwa 5 war.

**[0066]** Zusätzlich vergleichen die hergestellten IGF-I Formulierungen die Wirkungen auf die Arzneimittel-Beladung beim Ersetzen eines Nichtzuckers (Glycylglycin) durch einen Zucker (Saccharose) als den osmotischen Exzipienten. In einer Reihe von Formulierungen wurde das langkettige amphipathische Lipid, das verwendet wurde, um langsame Freisetzungseigenschaften zu vermitteln, von DEPC zu DOPC geändert, ohne signifikante Änderung des Modulierungstrends der Arzneimittelbeladung durch Einstellen der Osmolarität der ersten wässrigen Komponente. Um zu illustrieren, dass das Verfahren dieser Erfindung unabhängig von Variablen, wie der Batch-Größe und den Mischungsverfahren, das während des Herstellungsverfahrens verwendet wurde, ist, wurden die MVL Formulierungen in unterschiedlichen Batch-Größen und mit unterschiedlichen Mischertypen hergestellt. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Tests in den Tabellen 6A bis 6F zeigte, dass die umgekehrte Beziehung zwischen Osmolarität und Arzneimittel-Beladung unabhängig von dem chemischen Charakter eines beliebigen der osmotischen Exzipienten in der ersten wässrigen Komponente ist, und dass, für eine konstante Arzneimittel-Konzentration, der Trend der erhöhten Arzneimittelbeladung mit verringerter Osmolarität konsistent ist, obwohl die unterschiedlichen Batch-Größen und Mischungsverfahren einen etwas unterschiedlichen Beladungsgrad ergeben können.

**[0067]** Die folgenden Beispiele illustrieren die Art und Weise, in welcher die Erfindung ausgeführt werden kann. Es ist jedoch verständlich; dass die Beispiele für Illustrationszwecke sind und die Erfindung sollte nicht als Einschränkung auf eine beliebige der spezifischen Materialien oder Bedingungen hierin betrachtet werden.

#### Beispiel 1

##### Herstellung von Liposomen-Formulierungen

**[0068]** In allen den Verfahren zum Herstellen von MVLs, die hierin dargestellt sind, wurde in einem ersten Schritte eine „Wasser-in-Öl“ Emulsion durch Mischen einer Lipid-Komponente mit einer ersten wässrigen Komponente hergestellt. Die Lipidkomponente enthielt 0,5–4 ml 13,20 mM DOPC oder DEPC, 19,88 mM Cholesterol, 2,79 mM DPPG, und 2,44 mM Triolein (Avant Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) in Chloroform (Spectrum Chemical Manufacturing Corp., Gardena, CA) als Lösungsmittel. Ein gleiches Volumen (0,5–4 mL) einer ersten wässrigen Lösung, die Cytarabin, Leuprolid, Morphin, Enkephalin, oder IGF-I und variierende Konzentrationen eines osmotischen Exzipienten enthielt, wurde mit der Lipidkomponente unter Verwendung einer Vielzahl von Mischern gemischt, um die Wirkung der Osmolarität auf die Arzneimittelbeladung und die prozentuelle Ausbeute der verschiedenen getesteten Kombinationen zu bestimmen.

##### Herstellung von Cytarabin-enthaltenden MVL

**[0069]** Für Cytarabin enthielt die Lipidkomponente DEPC, anstelle von DOPC, und vier unterschiedliche erste wässrige Lösungen wurden hergestellt, wobei jede 40 mg/mL Cytarabin (Upjohn Co., Kalamazoo, MI) in 20 mM Zitronensäure (Sigma Chemical) und 0, 2,5 oder 8 Gew.-% Saccharose als den osmotischen Exzipienten-Wirkstoff enthielt. Eine Emulsion des Lipids und der ersten wässrigen Komponenten wurde durch Mischen von 0,5 mL der ersten wässrigen Komponente mit 0,5 ml der Lipidkomponente mittels eines Baxter® Vortexers bei der maximalen Geschwindigkeit (Einstellung 10) für 6 Minuten gebildet. Zu der resultierenden ersten Emulsion, wurden 2,5 mL einer Lösung, die 4 Gew.-% Glucose bzw. 40 mM Lysin (Spektrum Chemicals) enthielt, hinzugefügt. Die resultierende Mischung wurde emulgiert, um eine zweite Emulsion mit dem Baxter-Vortexer bei der maximalen Geschwindigkeit (Einstellung 10) für 4 Sekunden zu bilden. Die resultierende zweite Emulsion, eine „Wasser-in-Öl-in-Wasser“-Doppelemulsion, wurde für die sanfte Verwirbelung in einen 250 ml Erlenmeyer-Kolben, der 10 mL einer Lösung von 4 Gewichtsprozent Glukose und 40 mM Lysin enthält, überführt.

**[0070]** Um das organische Lösungsmittel (Chloroform) von den Partikeln abzdampfen, wurde Stickstoffgas über die zweite Emulsion bei 37°C für 20 Minuten unter leichtem Schütteln geleitet. Die resultierenden multivesikulären Liposomen wurde zweimal mit 50 mL normaler Salzlösung durch Zentrifugation bei 600 × g in einer Tischzentrifuge gewaschen und dann in 0,5–4 ml normaler Salzlösung resuspendiert. Die geschätzte Osmolarität (mOsm), prozentuelle Ausbeute, und Arzneimittelbeladung dieser Formulierungen sind in Tabelle 2 unten gezeigt.

Tabelle 2

Erste wässrige Lösung				Endgültige Liposomen-Suspension	
Cytarabin (mg/mL)	Saccharose (Gew./Vol.%)	Andere	Geschätzte Osmolarität (mOsm)	% Ausbeute	Arzneimittel- Beladung (mg/ml)
40	8,0	20 mM Zitronensäure	446,9	57,1	21,0
40	5,0	20 mM Zitronensäure	341,9	62,6	30,8
40	2,0	20 mM Zitronensäure	245,9	77,3	45,2
40	0,0	20 mM Zitronensäure	185,9	69,6	61,7

**[0071]** Diese Ergebnisse zeigen, dass die Arzneimittelbeladung durch Variieren der Osmolarität der ersten wässrigen Lösung moduliert werden kann, wobei eine verringerte Osmolarität zu einer erhöhten Arzneimittelbeladung führt. Die Zunahme der Arzneimittelbeladung, die durch Verringern der Osmolarität erreicht wird, führte zu keiner signifikanten Variation in der prozentuellen Ausbeute in der MVL Formulierung.

## Beispiel 2

## Herstellung von Met-Enkephalin-enhaltenden multivesikulären Liposomen-Formulierungen

**[0072]** Eine Lipidkomponente, die DEPC anstelle von DOPC enthielt, wurde wie in Beispiel 1 hergestellt. Die erste wässrige Komponente enthielt 5 mg/ml Met-Enkephalin (ein Pentapeptid) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in 25 mM Zitronensäure, und 0, 2,5 oder 5,0 Gew./Vol.% Saccharose als osmotischen Exzipienten. Der Rest der in Beispiel 1 beschriebenen Schritte wurden ausgeführt, um Met-Enkephalin enthaltende MVLs, die in normaler Salzlösung suspendiert sind, zu erhalten. Die geschätzte Osmolarität (mOsm), prozentuelle Ausbeute, und Arzneimittelbeladung dieser Formulierungen sind in Tabelle 3 unten gezeigt.

Tabelle 3

Erste wässrige Lösung				Endgültige Liposomen-Suspension	
Enkephalin (mg/mL)	Saccharose (Gew./Vol.%)	Andere	Geschätzte Osmolarität (mOsm)	% Ausbeute	Arzneimittel- Beladung (mg/ml)
5	5,0	25 mM Zitronensäure	191,5	77,5	6,4
5	2,0	25 mM Zitronensäure	111,5	71,8	13,4
5	0,0	25 mM Zitronensäure	35,5	72,5	50,8

**[0073]** Die Daten in Tabelle 3 zeigen wiederum, dass die Beladung von Met-Enkephalin durch Variieren der Osmolarität der ersten wässrigen Lösung moduliert wird, wobei das Verringern der Osmolarität zu einer erhöhten Arzneimittelbeladung führt. Folglich ist die Wirkung unabhängig von der Arzneimittelbeladung. Die prozentuelle Ausbeute ist durch die Abnahme der Osmolarität nicht signifikant verändert. Die Wirkung auf die Arzneimittelbeladung, die durch Variieren der Osmolarität der ersten wässrigen Komponente erhalten wird, wird ebenfalls festgestellt, wenn DEPC durch DOPC in der Lipidkomponente während der Herstellung ersetzt ist.

#### Beispiel 3

##### Herstellung von Leuprolid-enthaltenden multivesikulären Liposomen-Formulierungen

**[0074]** Eine Lipidkomponente, die DOPC anstelle von DEPC enthielt, wurde wie in Beispiel 1 hergestellt, mit Ausnahme, dass es Leuprolid und eine 3-fach höhere molare Konzentration von allen vier Lipiden in der Lipidkomponente enthielt. Die erste wässrige Komponente enthielt 15 mg/ml Leuprolidacetat (Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, PA) in 100 mM Phosphorsäure, und 4,0 oder 6,0 Gew./Vol.-% Saccharose als osmotischen Exzipienten. Die Verfahren von Beispiel 1 wurden nachgearbeitet, um die Leuprolid-enthaltenden MVLs zu erhalten, mit Ausnahme, dass 4 ml der ersten wässrigen Komponente mit 4 mL der Lipidkomponente unter Verwendung eines TK Autohomogenisators K bei einer Geschwindigkeit von 9000 U/min für 8 Minuten gemischt wurden, um die erste Emulsion zu erhalten. Zu der ersten Emulsion wurden 16 mL einer Lösung, die 4 Gew.-% bzw. 40 mM Lysin (Spekturm Chemicals) enthielt, hinzugefügt. Die resultierende Mischung wurde emulgiert, um eine zweite Emulsion mit dem TK Autohomogenisator K bei einer Geschwindigkeit von 4000 U/min für 1 Minute zu bilden. Die geschätzte Osmolarität (mOsm), prozentuelle Ausbeute, und Arzneimittelbeladung dieser Formulierungen sind in Tabelle 4 unten gezeigt.

Tabelle 4

Erste wässrige Lösung				Endgültige Liposomen-Suspension	
Leuproliid (mg/mL)	Saccharose (Gew./Vol.%)	Andere	Geschätzte Osmolarität (mOsm)	% Ausbeute	Arzneimittel-Beladung (mg/ml)
15	6,0	100 mM Phosphorsäure	328,6	56,2	10,9
15	4,0	100 mM Phosphorsäure	261,6	54,1	17,9

**[0075]** Wie in den Beispielen 1 und 2 oben, wird die Beladung von Leuproliid, einem 9-Aminosäure-Peptid, durch Variieren der Osmolarität der ersten wässrigen Lösung moduliert, wobei eine Verringerung der Osmolarität zu einer erhöhten Arzneimittelbeladung führt. Eine ähnliche prozentuelle Ausbeute wurde über den getesteten Osmolaritätsbereich aufrechterhalten. Es wurde auch gezeigt, dass dieses Ergebnis unabhängig von der Mixerart ist, die verwendet wurde, um die erste und zweite Emulsion bei der Herstellung der MVLs zu erzeugen.

## Beispiel 4

## Herstellung von Morphin-enthaltenden multivesikulären Liposomen-Formulierungen

**[0076]** Eine Lipidkomponente, die DEPC anstelle von DOPC enthielten, wurde wie in Beispiel 1 hergestellt. Die erste wässrige Komponente enthielt 17 mg/ml Morphinsulfat (Mallinckrodt Chemical Inc., St. Louis, MO) in 10 mM Salzsäure, und 0,2, 2,5 oder 5,0 Gew.-(Vol.-% Saccharose als osmotischen Exzipienten. Die restlichen in Beispiel 1 beschriebenen Schritte wurden ausgeführt, um Morphinsulfat enthaltende MVLs zu erhalten, die in normaler Salzlösung suspendiert sind. Die geschätzte Osmolarität (mOsm), prozentuelle Ausbeute, und Arzneimittelbeladung dieser Formulierungen sind in Tabelle 5 unten gezeigt.

Tabelle 5

Erste wässrige Lösung				Endgültige Liposomen-Suspension	
Morphinsulfat (mg/mL)	Saccharose (Gew./Vol.%)	Andere	Geschätzte Osmolarität (mOsm)	% Ausbeute	Arzneimittel-Beladung (mg/ml)
17	4,8	10 mM HCl	258,7	39,2	13,3
17	1,8	10 mM HCl	162,7	58,5	23,1
17	0,2	10 mM HCl	114,7	48,1	29,0

**[0077]** Wiederum wurde die Beladung von Morphin, einem Lipid-löslichen Arzneimittel, durch Variieren der

Osmolarität der ersten wässrigen Lösung moduliert, wobei eine Verringerung der Osmolarität zu einer erhöhten Arzneimittelbeladung führte. Die prozentuelle Ausbeute der MVL Formulierung war im Wesentlichen über den getesteten Osmolaritätsbereich äquivalent.

## Beispiel 5

## Herstellung von IGF-I-enthaltenden multivesikulären Liposomen-Formulierungen

## 1. Herstellung von MVLs in einem 0,5 ml Maßstab

**[0078]** Eine Lipidkomponente, die DEPC anstelle von DOPC enthielt, wurde wie in Beispiel 1 hergestellt. Die erste wässrige Komponente enthielt 50 mg/ml IGF-I und 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, oder 5,0 Gew./Vol.-% Saccharose als osmotischen Exzipienten. Die restlichen der in Beispiel 1 beschriebenen Schritte wurden ausgeführt, um IGF-I enthaltende MVLs zu erhalten, die in normaler Salzlösung suspendiert sind. Die geschätzte Osmolarität (mOsm), prozentuelle Ausbeute, und Arzneimittelbeladung dieser Formulierungen sind in Tabelle 6A unten gezeigt.

Tabelle 6A

Erste wässrige Lösung				Endgültige Liposomen-Suspension	
IGF-I (mg/mL)	Saccharose (Gew./Vol.%)	Andere	Geschätzte Osmolarität (mOsm)	% Ausbeute	Arzneimittel-Beladung (mg/ml)
20	5,0	100 mM HCl	347,0	51,6	37,7
20	2,5	100 mM HCl	267,0	47,5	46,1
50	2,5	100 mM HCl	271,0	44,6	45,7
50	0,0	100 mM HCl	195,0	53,4	73,2

**[0079]** Obwohl die Beladung von IGF-1 mit den Ergebnissen konsistent ist, die erhalten wurden, wenn Zitronensäure als der Puffer verwendet wurde, zeigte IGF-I dann einen gewissen Abbau in den Studien, die durchgeführt wurden, um das eingekapselte Protein zu charakterisieren.

## 2. Herstellung von MVLs in einem 4 ml Maßstab

**[0080]** Eine Lipidkomponente, die DOPC anstelle von DEPC enthielt, wurde wie in Beispiel 1 hergestellt. Ein erster Satz von Formulierungen verwendete eine erste wässrige Komponente, die 20 mg/ml IGF-I (Chiron Corp., Emeryville, CA) in 100 mM Salzsäure und 2,5, oder 5,0 Gew./Vol.-% Saccharose als osmotischen Exzipienten enthielt. Ein zweiter Satz verwendete 50 mg/ml IGF-1 in 100 mM Salzsäure und 0 oder 2,5 Gew./Vol.-% Saccharose als osmotischen Exzipienten. Die Verfahren von Beispiel 1 wurden nachgearbeitet, um die IGF-I enthaltenden MVLs zu erhalten, mit Ausnahme, dass 4 ml der ersten wässrigen Komponente mit 4 ml der Lipidkomponente unter Verwendung eines TK Autohomogenisators K bei einer Geschwindigkeit von 9000 U/min für 8 Minuten gemischt wurden, um die erste Emulsion zu erhalten. Zu der ersten Emulsion wurden 16 ml einer Lösung hinzugefügt, die 4 Gew.-% Glucose bzw. 40 mM Lysin (Spectrum Chemicals) enthielt. Die resultierende Mischung wurde emulgiert, um eine zweite Emulsion mit dem TK Autohomogenisator K bei einer Geschwindigkeit von 4000 U/min für 1 Minute zu bilden. Die geschätzte Osmolarität (mOsm), prozentuelle Aus-

beute, und Arzneimittelbeladung dieser Formulierungen unter Verwendung eines Vortex-Mischers und DEPC, einem Lipid mit einer 22 Kohlenstoffkette, sind in Tabelle 6B unten gezeigt:

Tabelle 6B

Erste wässrige Lösung				Endgültige Liposomen-Suspension	
IGF-I (mg/mL)	Saccharose (Gew./Vol.%)	Andere	Geschätzte Osmolarität (mOsm)	% Ausbeute	Arzneimittel- Beladung (mg/ml)
50	5,0	0,0	162,7	57,0	49,8
50	2,5	0,0	82,7	62,4	76,8
50	1,0	0,0	36,7	54,9	97,4
50	0,5	0,0	21,7	66,0	157,1
50	0,25	0,0	14,2	67,0	159,4
	0		6,7	N/A	

**[0081]** Tabelle 6B zeigt, dass die Beladung, die mit dem TK Mischerverfahren erhalten wird, ähnlich zu jenen ist, die erhalten wurde, wenn ein Vortex-Mischer verwendet wird, um die Emulsionen herzustellen. Die Studien, die durchgeführt wurden, um das eingekapselte Protein zu charakterisieren, zeigten jedoch ein verstärktes Vorhandensein von IGF-I Oligomeren in der Abwesenheit eines Säure-Puffers.

### 3. Herstellung von MVLs in einem 3 ml Maßstab

**[0082]** Eine Lipidkomponente, die DEPC anstelle von DOPC enthielt, wurde wie in Beispiel 1 hergestellt. Die erste wässrige Komponente enthielt eine der drei Formulierungen: (1) 30 mg/ml IGF-I in 25 mM Zitronensäure, und 0 oder 2,5 Gew./Vol.-% Saccharose als osmotischen Exzipienten, (2) oder 50 mg/mL IGF-I in 25 mM Zitronensäure, und 2,5, 1,0, 0,5 oder 0 Gew./Vol.-% Saccharose, (3) oder 50 mg/ml IGF-I ohne Zitronensäure, und 0 oder 0,5 Gew./Vol.-% Saccharose. Die Verfahren von Beispiel 1 wurden nachgearbeitet, um die MVLs, die IGF-I enthalten, zu erhalten, mit der Ausnahme, dass 3 mL der ersten wässrigen Komponente mit 3 ml der Lipidkomponente unter Verwendung eines Omni Mixers ES bei einer Geschwindigkeit von 10.000 U/min für 12 Minuten gemischt wurden, um die erste Emulsion zu erhalten. Zu der ersten Emulsion wurden 20 ml einer Lösung hinzugefügt, die 4 Gew.-% Glucose bzw. 40 mM Lysin (Spectrum Chemicals) enthielt. Die resultierende Mischung wurde emulgiert, um eine zweite Emulsion mit dem Omni Mixer ES bei einer Geschwindigkeit von 4500 U/min für 2 Minute zu bilden. Die geschätzte Osmolarität (mOsm), prozentuelle Ausbeute, und Arzneimittelbeladung dieser Formulierungen sind in Tabelle 6C unten gezeigt:

Tabelle 6C

Erste wässrige Lösung				Endgültige Liposomen-Suspension	
IGF-I (mg/mL)	Saccharose (Gew./Vol.%)	Andere	Geschätzte Osmolarität (mOsm)	% Ausbeute	Arzneimittel- Beladung (mg/ml)
30	2,5	25 mM Zitronensäure	106,8	69,2	54,8
30	0,0	25 mM Zitronensäure	30,8	57,2	132,2
50	0,5	0,0	21,7	80,0	171,4
50	0,0	0,0	6,7	72,7	267,5
50	2,5	25 mM Zitronensäure	109,5	60,3	82,5
50	1,0	25 mM Zitronensäure	63,5	72,3	138,2
50	0,5	25 mM Zitronensäure	48,5	71,5	174,2
50	0,0	25 mM Zitronensäure	33,5	65,8	175,7

**[0083]** Die Ergebnisse in Tabelle 6C zeigen eine ähnliche Modulation der Arzneimittelbeladung durch die Osmolarität für jede der getesteten Arzneimittelkonzentrationen.

#### Beispiel 6

##### Herstellung von eingekapselten IGF-I in einem 125 ml Maßstab

**[0084]** Eine Standard Lipidkomponente, die DEPC anstelle von DOPC enthielt, wurde wie für andere Arzneimittel-Formulierungen hergestellt. Die erste wässrige Komponente enthielt 15 mg/ml IGF-I, das entweder in einer 5% Saccharose/20 mM Ammoniumcitrat-Lösung, oder in einer 8% Saccharose/20 mM Ammoniumcitrat-Lösung aufgelöst ist. 125 ml der ersten wässrigen Lösung wurden mit 125 ml der Lipidkomponente unter Verwendung eines hochscherenden Doppelmisch-Gefäßsystems gemischt, um die erste Emulsion zu erhalten. Dieses Mischsystem modelliert den Herstellungsmaßstabsprozess, und wird für die Maßstabsvergrößerung der eingekapselten Arzneimittel-Formulierungen verwendet. Die wässrigen und organischen Komponenten wurden bei einer Geschwindigkeit von 8000 U/min für 30 Minuten in dem ersten Emulsionsgefäß gemischt. Die erste Emulsion wurde dann bei einer Rate von 167 ml/min in einen Fluidstrom, der aus 0,04 N Ammoniumhydroxid in 1,5% Glycidlösung besteht, der bei 2400 ml/min fließt, gepumpt und mittels eines in-line statischen Mixers gemischt, um die zweite Emulsion zu erhalten. Die Gesamtflussrate durch den statischen Mischer war 2567 ml/min. Bei dieser Rate war die erste Emulsion nach 90 Sekunden aufgebraucht. Die zweite Emulsion wurde bei Eintritt in ein Aufnahmegefäß mit einer Lysin-Lösung gemischt, und dann unmittelbar mit

Stickstoff gespült, um das organische Lösungsmittel abziehen. Die geschätzte Osmolarität (mOsm), prozentuelle Ausbeute, Arzneimittel-Beladung, und % freies Arzneimittel für diese Formulierungen sind in Tabelle 7 unten gezeigt.

Tabelle 7

Erste wässrige Lösung			Endgültige Liposomen-Suspension					
IGF-I (mg/ml)	Saccharose (Gew/Vol-%)	Andere	Geschätzte Osmolarität	% Ausbeute	Susp. (mg/ml)	% Lipokrit	Arzneimittelbeladung (mg/ml)	% freies IGF-I
15	8,0	20 mM Ammonium-citrat	~ 321 mOsm	42	5,1	41,8	12,2	0,18
15	5,0	20 mM Ammonium-citrat	~ 216 mOsm	56	5,8	36,7	15,8	0,24

**[0085]** Die Ergebnisse in Tabelle 7 oben zeigen eine ähnliche Zunahme der Arzneimittelbeladung bei verringerter Saccharosekonzentration, wie für die anderen untersuchten Arzneimittelformulierungen.

## Beispiel 7

## Wirkung des Austausches von Glycylglycin als den osmotischen Exzipienten

**[0086]** Eine Lipidkomponente, die DEPC anstelle von DOPC enthielt, wurde wie in Beispiel 1 hergestellt. Die erste wässrige Komponente enthielt 10 mg/ml IGF-I in 25 mM Zitronensäure, und 0, 1,0 oder 2,0 Gew./Vol.-% Glycylglycin als osmotischen Exzipienten. Die restlichen der in Beispiel 1 beschriebenen Schritte wurden ausgeführt, um IGF-I enthaltende MVLs zu erhalten, die in normaler Salzlösung suspendiert sind. Die geschätzte Osmolarität (mOsm), prozentuelle Ausbeute, und Arzneimittelbeladung dieser Formulierungen sind in Tabelle 6 D unten gezeigt.

Tabelle 6D

Erste wässrige Lösung				Endgültige Liposomen-Suspension	
IGF-I (mg/ml)	Glycylglycin (Gew/Vol%)	Andere	Geschätzte Osmolarität (mOsm)	% Ausbeute	Arzneimittelbeladung (mg/ml)
10	2,0	25 mM Zitronensäure	180,1	64,0	10,4
10	1,0	25 mM Zitronensäure	104,1	53,0	13,0
10	0,0	25 mM Zitronensäure	28,1	41,7	24,4

**[0087]** Eine ähnliche osmotische Modulierung der Arzneimittelbeladung ist für Formulierungen unter Verwendung eines Nichtzucker osmotischen Spacers, Glycylglycin, anstelle von Saccharose gezeigt. Folglich ist die

Wirkung der Osmolarität auf die Arzneimittel-Beladung, gezeigt durch die Daten in der Tabelle 6D, unabhängig von der chemischen Struktur des verwendeten osmotischen Exzipienten.

**[0088]** Vergleich der unterschiedlichen osmotischen Exzipienten bei gleicher osmotischer Stärke MVLs wurden mit dem Verfahren von Beispiel 1 hergestellt, die IGF-I, die entweder mit 2,5 Gew./Vol.-% Saccharose oder 1,0 Gew./Vol.-% Glycylglycin als osmotischen Exzipienten bei ungefähr gleicher osmotischer Stärke eingekapselt sind, enthielten. Für den Vergleich wurde 2,5 Gew./Vol.-% Saccharose oder 1,0 Gew./Vol.-% Glycylglycin als der osmotische Exzipient in die erste wässrige Komponente eingeführt, die 80 mg/ml IGF-I und 25 mM Zitronensäure enthielt.

**[0089]** Die Verfahren von Beispiel 1 wurden nachgearbeitet, um die IGF-I enthaltenden MVLs zu erhalten, mit Ausnahme, dass 3 ml der ersten wässrigen Komponente mit 3 mL der Lipidkomponente unter Verwendung eines Omni Mixers ES bei einer Geschwindigkeit von 10.000 U/min für 20 Minuten gemischt wurden, um die erste Emulsion zu erhalten. Zu der ersten Emulsion wurden 20 mL einer Lösung, die 4 Gew.-% bzw. 40 mM Lysin (Spekturm Chemicals) enthielt, hinzugefügt. Die resultierende Mischung wurde emulgiert, um eine zweite Emulsion mit dem Omni Mixer ES bei einer Geschwindigkeit von 4500 U/min für 2 Minute zu bilden.

**[0090]** Um zu bestimmen, ob die Wirkung auf die Arzneimittel-Beladung nur der Osmolarität der ersten wässrigen Komponente zuzuschreiben ist, wurde eine dritte Formulierung, wie oben beschrieben, hergestellt, mit Ausnahme, dass sowohl die Konzentration des osmotischen Exzipienten als auch die des IGF-1s proportional verringert wurden (von 80 mg/ml IGF-I und 2,5% Saccharose auf 50 mg/ml IGF-I und 1,0% Saccharose). In dieser Formulierung ersetzte die zweite wässrige Komponente 1,5 % Glycin und 40 mM Lysin anstelle von 4% Glucose und 40 mM Lysin, die in Beispiel 1 verwendet wurden. Tabelle 6E unten vergleicht die geschätzte Osmolarität, % Ausbeute, und Arzneimittelbeladung in der endgültigen Liposomen-Suspension für diese drei Formulierungen.

**[0091]** Ein Vergleich der geschätzten Osmolarität (mOsm), prozentuelle Ausbeute, und Arzneimittelbeladung dieser Formulierungen sind in Tabelle 6E unten gezeigt:

Tabelle 6E

Erste wässrige Lösung				Endgültige Liposomen-Suspension	
IGF-I (mg/ml)	Osmotischer Spacer (Gew/Vol%)	Andere	Geschätzte Osmolarität (mOsm)	% Ausbeute	Arzneimittelbeladung (mg/ml)
80 (A)	2,5 % Saccharose	25 mM Zitronensäure	113,5	85,9	145,1
80 (B)	1 % Glycylglycin	25 mM Zitronensäure	113,5	77,4	156,4
50 (C)	1 % Saccharose	25 mM Zitronensäure	63,5	75,7	142,5

**[0092]** Die Daten in Tabelle 6E zeigt, dass die Osmolarität des osmotischen Exzipienten das Ergebnis einer effektiven Variable ist, da zwei unterschiedliche osmotische Spacer bei etwa gleicher osmotischer Stärke, jedoch ungleicher molarer Konzentration, eine vergleichbare Wirkung auf die Arzneimittelbeladung hervorrufen.

## Beispiel 8

Bestimmung der prozentuellen Einkapselung (oder prozentuellen Ausbeute), Lipokrit, prozentuell freies Arzneimittel, Partikelgrößen-Verteilung und Arzneimittelbeladung

**[0093]** Tabellen 2 bis 6A–E zeigen die geschätzte Osmolarität (mOsm), % Ausbeute und Arzneimittelbeladung (mg/ml) für die liposomalen Formulierungen, die in den Beispiel 1–6 oben beschrieben sind. Diese Parameter wurden wie folgt erhalten:

Die prozentuelle Einkapselung (oder prozentuelle Ausbeute) des Arzneimittels wurde als der Prozentsatz der Arzneimittelmenge in der endgültigen Liposomen-Suspension zu der gesamten Arzneimittelmenge berechnet, die in der ersten wässrigen Lösung verwendet wurde. Folglich wurde die prozentuelle Ausbeute des Arzneimittels als das Verhältnis der Arzneimittelkonzentration in der endgültigen Suspension mal dem Volumen der endgültigen Suspension zu der Arzneimittelkonzentration in der ersten wässrigen Lösung mal dem Volumen der ersten wässrigen Lösung berechnet. Lipokrit wurde in Analogie zu Hämatokrit berechnet, und zwar als prozentuelles Verhältnis des Pelletvolumens zu dem Suspensionsvolumen (siehe Bedingungen unten, für das Erhalten des Pelletvolumens).

**[0094]** Prozentuell freies Arzneimittel wurde als das prozentuelle Verhältnis der Menge des Arzneimittels im Überstand zu der Arzneimittelmenge in der Endsuspension berechnet. Das prozentuell freie Arzneimittel kann auch als das prozentuelle Verhältnis der Arzneimittelkonzentration im Überstand zu der in der Suspension, mal (1-Lipokrit) berechnet werden. Die Arzneimittelbeladung, die die Menge an Arzneimittel misst, die in jeder Einheit des eingekapselten Volumens eingekapselt ist, ist etwa gleich zu und kann geschätzt werden (unter der Annahme eines geringen Prozentsatzes an freiem Arzneimittel) als das Verhältnis der Arzneimittelkonzentration der endgültigen Liposomensuspension zu dem Lipokrit. Diese Variablen wurden, wie unten spezifischer beschrieben ist, bestimmt.

**[0095]** Um den Lipokrit zu bestimmen, wurde etwa 50 µL der multivesikulären Liposomensuspension in einem Kapillarenröhrchen aufgenommen, und das Ende des Röhrchens wurde versiegelt, während sichergestellt wurde, dass die Suspension keine Luftblasen enthielt. Die Suspension wurde in einer Zentrifuge bei 600 × g für 10 Minuten zentrifugiert, um eine Pelletschicht und eine Überstandsschicht zu erhalten. Das prozentuelle Verhältnis der Länge des Röhrchens, die durch das Pellet eingenommen wird, zu jener, die durch die Suspension eingenommen wird, ergibt den Lipokrit.

**[0096]** Für die Verwendung zum Bestimmen der Menge an freiem Arzneimittel in einer Formulierung wurde Überstand durch Zentrifugieren von etwa 0,2 mL Suspension für 3 Minuten bei 600 × g in einem Eppendorf® Zentrifugenröhrchen erhalten. Für Cytarabin- und Morphin-Formulierungen wurde 25–50 µL des Überstandes abgezogen und in ein Glasröhrchen, das 1 ml 3:1 Vol./Vol. Isopropanylalkohol:1 N Salzsäure (Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ) pipettiert und kräftig gemischt, um eine klare Lösung zu erhalten. Die Absorbanz bei 280 nm für Cytarabin, oder bei 285 nm für Morphin wurde mit einem Spektrophotometer (Hitachi® U-2000) gemessen. Für Leuprolid-Formulierungen wurden 50 µl des Überstandes abgezogen und in ein Glasröhrchen, das 2 ml 1:1 Isopropylalkohol:Wasser, titriert auf pH 10 mittels 0,1 N Ammoniumhydroxid, enthält, pipettiert, gefolgt von kräftigem Mischen, um eine klare Lösung zu erhalten. Die Absorbanz bei 280 nm wurde dann mit einem Spektrophotometer (Hitachi® U-2000) gemessen. Für Enkephalin und IGF-I wurden 25–50 µL des Überstandes abgezogen und in ein Glasröhrchen, das 1 ml 3:1 Vol./Vol. Isopropylalkohl:2 N Zitronensäure (Sigma Chemical) enthält, pipettiert, gefolgt von kräftigem Mischen, um eine klare Lösung zu erhalten. Die Absorbanz bei 275 nm für Enkephalin und IGF-I wurde mit einem Spektrophotometer (Hitachi® U-2000) gemessen. Unter Verwendung eines Referenzabsoranzstandards, der basierend auf den Arzneimittellösungen von bekannten Konzentrationen in derselben Auflösungslösung etabliert wurde, wurden die Arzneimittelkonzentrationen in der Suspension und dem Überstand berechnet.

**[0097]** Die Partikelgrößenverteilung und der mittlere Partikeldurchmesser wurden durch das Verfahren der Laserlicht-Diffraktion mittels eines LA-500 oder LA-910 Partikelgrößen-Analysators von Horiba Inc. (Irvine, CA) bestimmt. Der Volumen-gewichtete mittlere Partikeldurchmesser für alle untersuchten Formulierungen war im Allgemeinen im Bereich von etwa 6 bis 18 µm.

## Beispiel 9

In vitro und In vivo Freisetzung von hoch Arzneimittel-beladenen, hochprozentige Ausbeute IGF-I Formulierungen

**[0098]** Die physikochemische Integrität des eingekapselten IGF-I wurde durch SDS-PAGE Untersuchung mittels Novex® NuPage-Gels sowie durch RP-HPLC Untersuchung unter Verwendung einer C18 symmetrischen Säule bestätigt. Das eingekapselte Protein wurde mit 75:25 IPA:2N Zitronensäure extrahiert. Die Bioaktivität des eingekapselten IGF-I wurde durch eine mitogene Biountersuchung unter Verwendung einer MG-63 humanen Osteosarcoma Zelllinie und 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Farbstoff gemäß dem Verfahren von W. Lopaczynski et al., *Regulatory Peptides*, 48: 207–216, 1993 bestätigt. Die MG-63 Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC# CRL 1427) erhalten, und die Dosis-abhängige mitogene Reaktion von ruhenden MG-63 Zellen zu hinzugefügtem IGF-I wurde bestimmt. Die Bioaktivität von extrahiertem IGF-I wurde als etwa äquivalent zu jener eines nicht eingekapselten Standards bestätigt.

**[0099]** In vitro Experiment: In Kürze, ein in vitro Freisetzungsexperiment wurde aufgebaut und wie folgt durchgeführt: eine MVL Suspension, die etwa 50 mg/ml IGF-I enthielt, wurde 20 fach in humanes Plasma, das 0,01% NaN<sub>3</sub> enthielt, verdünnt; eine 0,5 ml Probe in einen Eppendorf-Röhrchen mit Schraubverschluss wurde für jeden Zeitpunkt verwendet, und die Proben wurden unter dynamischen/Drehbedingungen bei 37°C inkubiert. Zeitpunkt-Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten genommen und mit 0,9 ml normaler Salzlösung gewaschen.

**[0100]** Partikelpellets wurden dann durch Zentrifugation in einer Mikrofuge bei 16.000 g für 4 Minuten erhalten und bei –20°C bis zur RP-HPLC Analyse unter Verwendung einer C18 symmetrischen Säule gelagert. [Fig. 1](#) zeigt einige in vitro Plasma-Freisetzungsdaten, die für die drei in Tabelle 6E aufgelisteten, repräsentativen IGF-I Formulierungen erhalten wurden. Diese Daten weisen daraufhin, dass eine verzögerte Freisetzung von IGF-I über eine Periode von mehreren Tagen für hoch Arzneimittel-beladene, hochprozentige Ausbeute IGF-I Formulierungen erreicht wird.

**[0101]** In vivo Experiment: Männliche Ratten wurden subkutan die drei, in Tabelle 6E gezeigten, MVL-Formulierungen injiziert, um Informationen über die in vivo Freisetzungseigenschaften zu erhalten. Jede Ratte erhielt eine 10 mg Dosis IGF-I, und jede der untersuchten Formulierungen wurde in 3 Ratten injiziert. Blutproben (0,2 ml) wurde zu folgenden Zeitpunkten gesammelt: Null, und 1, 3, 5, und 7 Tag(e) nach der Injektion und zwar von der Schwanzvene der Ratten und ermöglicht zu gerinnen. Serum wurde dann durch Zentrifugation erhalten, und bei –70°C vor der Untersuchung auf die IGF-I Konzentration mittels eines IGF-I ELISA Satzes DSL-10-5600 (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX gemäß den Herstellerangaben) gelagert.

**[0102]** [Fig. 2](#) zeigt den zeitlichen Verlauf der durchschnittlichen Serum IGF-I Konzentration von drei Ratten, die die 10 mg IGF-I der Formulierung A in Tabelle 6E erhielten. Diese Daten weisen darauf hin, dass ein anhaltender Serumspiegel von IGF-I über eine Periode von vielen Tagen unter Verwendung von hoch Arzneimittel-beladenen, hochprozentigen Ausbeute IGF-I Formulierungen erreicht werden kann.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Steuern des Ladens eines biologischen aktiven Wirkstoffes in ein Liposom, welches Verfahren aufweist:

(a) Modulieren des Ladens eines biologischen aktiven Wirkstoffes in ein Liposom durch Einstellen der Osmolarität einer wässrigen Lösung, in welcher der Wirkstoff aufgelöst ist, wobei die Osmolarität der wässrigen Lösung erhöht wird, um die Wirkstoffbeladung zu verringern, oder verringert wird, um die Wirkstoffbeladung zu erhöhen; und dann

(b) Einkapseln der wässrigen Lösung in das Liposom.

2. Verfahren zum Herstellen eines multivesikularen Liposoms mit mehreren nicht-konzentrischen Kammern, wobei die Membranen durchwegs als ein kontinuierliches Netzwerk verteilt sind und mit einer gesteuerten Beladung eines biologisch aktiven Wirkstoffs darin, wobei das Verfahren die Schritte aufweist:

(a) Bilden einer Wasser-in-Öl Emulsion aus zwei nicht-mischbaren Komponenten, wobei die zwei nicht-mischbaren Komponenten sind: (i) eine Lipidkomponente, die zumindest ein organisches Lösungsmittel, zumindest ein amphipathisches Lipid und ein neutrales Lipid, dem eine hydrophile Kopfgruppe fehlt, aufweist, und (ii) eine erste, wässrige Komponente, die zumindest einen biologisch aktiven Wirkstoff aufweist, und eine Osmolarität

besitzt, die gewählt ist, um das Laden des biologisch aktiven Wirkstoffs in die multivesikulären Liposomen zu modulieren:

(b) Dispergieren der Wasser-in-Öl Emulsion, die den biologisch-aktiven Wirkstoff enthält, in eine zweite wässrige Komponente, um Lösungsmittelkügelchen zu bilden; und danach

(c) Entfernen des organischen Lösungsmittels aus den Lösungsmittelkügelchen, um die multivesikulären Liposomen, die in der zweiten wässrigen Komponente suspendiert sind, zu bilden; wobei das Verringern der Osmolarität der ersten wässrigen Komponente zu einer erhöhten Arzneimittelbeladung führt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die wässrige Lösung weiters einen osmotischen Exzipienten in einer Konzentration aufweist, die ausgewählt ist, um die Osmolarität zu modulieren.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der osmotische Exzipient Saccharose ist, oder aus der Gruppe bestehend aus Glucose, Glycin und Glycylglycin ausgewählt ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Osmolarität im Bereich von etwa 0,01 mOsm bis etwa 1100 mOsm ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Osmolarität im Bereich von etwa 5 mOsm bis etwa 400 mOsm ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der biologisch-aktive Wirkstoff Cytarabin ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Osmolarität der wässrigen Lösung im Bereich von etwa 185 mOsm bis etwa 450 mOsm ist.

9. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der biologisch-aktive Wirkstoff Morphin ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Osmolarität der wässrigen Lösung im Bereich von etwa 114 mOsm bis etwa 260 mOsm ist.

11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der biologisch-aktive Wirkstoff Enkephalin ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Osmolarität der wässrigen Lösung im Bereich von etwa 35,4 mOsm bis etwa 191,5 mOsm ist.

13. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der biologisch-aktive Wirkstoff Leuprolid ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Osmolarität der wässrigen Lösung im Bereich von etwa 261,6 mOsm bis etwa 328,6 mOsm ist.

15. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der biologisch aktive Wirkstoff ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Anästhetikum, einem antiasthmatischen Wirkstoff, einem Herzglycosid, einem Antihypertensivum, einer Nukleinsäure, einem Antibiotikum, einer Vakzine, einem Antiinflammatorikum, einem Antiarrhythmikum, einem Antiangina, einem Hormon, einem Antidiabetikum, einem Antineoplastikum, einem Immunmodulator, einem Antifungal, einem Beruhigungsmittel, einem Steroid, einem Sedativum, einem Analgetikum, einem Vasopressor, einem antiviralen Mittel, einem Herbizid, einem Pestizid, einem Protein, einem Peptid, einem Neurotransmitter, einem Radionuklid, und geeigneten Kombinationen davon.

16. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der osmotische Exzipient ausgewählt ist, nach

(a) um die Osmolarität der ersten wässrigen Komponente zu verringern, wodurch die biologisch-aktive Wirkstoffbeladung erhöht wird; oder

(b) um die Osmolarität der ersten wässrigen Komponente zu erhöhen, wodurch die biologisch-aktive Wirkstoffbeladung verringert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Lipidkomponente zumindest ein amphipathisches Lipid mit etwa 13 bis etwa 28 Kohlenstoffatomen in seiner Kohlenstoffkette aufweist.

18. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Lipidkomponente zumindest ein amphipathisches Lipid mit etwa 18 bis etwa 22 Kohlenstoffatomen in seiner Kohlenstoffkette aufweist.

19. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die amphiphatische Lipidkomponente zumindest ein zwitterionisches amphipathisches Lipid, ein kationisches amphipathisches Lipid, oder ein anionisches amphipathisches Lipid aufweist.

20. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der biologisch-aktive Wirkstoff Enkephalin ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Osmolarität der ersten wässrigen Komponente im Bereich von etwa 35,4 mOsm bis etwa 191,5 mOsm ist, und die entsprechende Enkephalin-Beladung im Bereich von etwa 6,4 mg/ml bis etwa 50,8 mg/ml der Formulierung ist.

22. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die zweite wässrige Komponente einen osmotischen Exzipienten aufweist, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Glycylglycin, Glucose, Saccharose, Trehalose, Succinat, Cyclodextrin, Arginin, Galactose, Mannose, Maltose, Mannitol, Glycin, Lysin, Glucuronsäure, Citrat, Sorbitol, Dextran, Natriumchlorid und Kombinationen davon.

23. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Osmolarität der ersten wässrigen Komponente gewählt ist, um die Freisetzungsrates aus dem multivesikulären Liposom in eine physiologisch-relevante wässrige Umgebung zu modulieren.

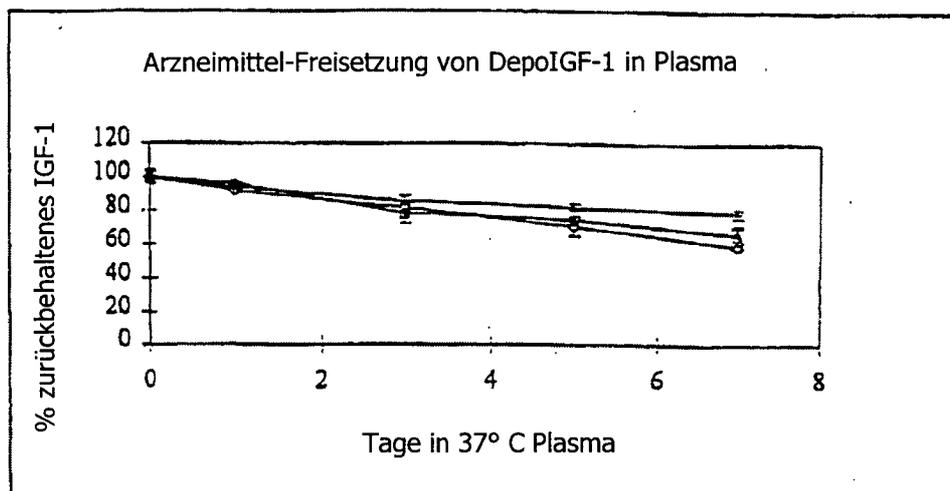
24. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das neutrale Lipid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Triolein, Tripalmitolein, Tricaprin, Trilinolein, Trilourin, Tricaprylin, Squalen, und Kombinationen davon.

25. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das organische Lösungsmittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ether, Kohlenwasserstoffen, halogenierten Kohlenwasserstoffen, halogenierten Ether, Ester, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, Freonen, und Kombinationen davon.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

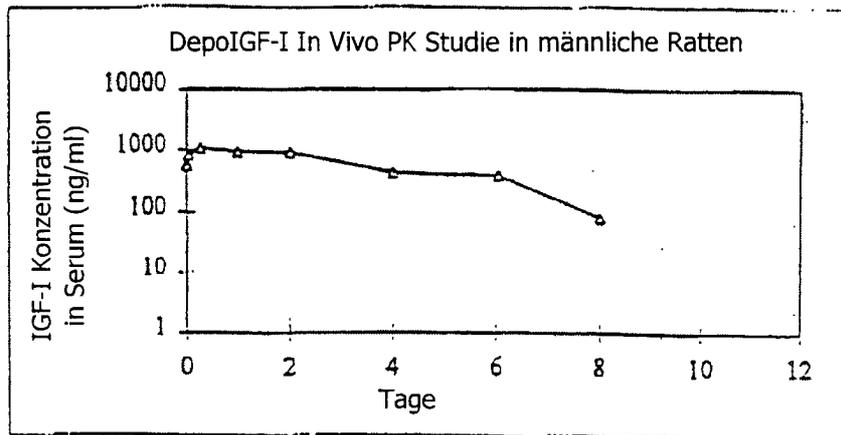
## Anhängende Zeichnungen

In vitro Plasma-Freisetzungseigenschaften von IGF-I, das in multivesikulären Liposomen eingekapselt ist. Diese drei Formulierungen entsprechen jenen, die in Tabelle 6E dargestellt sind: (A) offene Raute; (B) offenes Dreieck; und (C) Kreuz; mit Fehlerbalken, die die Standardabweichung darstellen. Die Daten weisen auf eine verzögerte Freisetzung von IGF-I hin.



FIGUR 1

In vivo Pharmakokinetik von in multivesikulären Liposomen eingekapselten IGF-I (Formulierung A in Tabelle 6E) nach einer subkutanen Injektion einer 10mg Dosis in männliche Ratten. Die Daten (Mittelwert von drei Ratten) demonstrieren eine verzögerte Freisetzung von IGF-I über eine Periode von einer Woche



FIGUR 2