



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 14 385 T3** 2005.05.25

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 831 779 B2**

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

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 14 385.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/08622**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 918 002.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/40063**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.06.1996**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **19.12.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.04.1998**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **08.08.2001**

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **19.01.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.05.2005**

(30) Unionspriorität:  
**475581            07.06.1995    US**

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

(73) Patentinhaber:  
**U.S. DEPARTMENT OF THE ARMY, Fort Detrick,  
Md., US**

(72) Erfinder:  
**ALVING, L., Carl, Bethesda, US; OWENS, R.,  
Roberta, Silver Spring, US; WASSEF, M., Nabila,  
Potomac, US**

(74) Vertreter:  
**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European  
Patent Attorneys, 81671 München**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung einer Liposomenpräparation**

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**

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung multilamellarer Liposomenpräparationen bzw. -zubereitungen, wobei die Liposomen ein Material, wie ein Antigen oder einen Arzneistoff, einkapseln. Die Präparationen können für Vakzine oder die Arzneistoffabgabe verwendet werden.

## Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Liposomen sind als Arzneistoff- bzw. Wirkstoffträger zur Arzneistoff- bzw. Wirkstoffabgabe in vivo verwendet worden. In Liposomen eingekapselte Wirkstoffe weisen die folgenden Vorteile auf:

**[0003]** Die Wirkstoffe sind innerhalb einer relativ impermeablen Doppelschichtmembran eingekapselt, wo der Arzneistoff vor der Umgebung geschützt ist,

**[0004]** Liposomen können von Zellen ohne offenkundige zytotoxische Auswirkungen aufgenommen werden, was die zelluläre Aufnahme des eingekapselten Materials verstärkt, das Einkapseln verändert die Pharmakokinetiken und Liposomen sind natürlich, bioabbaubar und nicht-toxisch.

**[0005]** Mayhew et al. „Therapeutic Applications of Liposomes" in Liposomes, M. J. Ostro, ed. (Marcel Dekker, Inc., 1983) S. 289–341. Es wird angenommen, daß die gleichen Vorteile beobachtet werden, wenn die Liposomen Antigene einkapseln.

**[0006]** Es gibt einige bekannte Verfahren zur Herstellung von in multilamellaren Liposomen eingekapseltem Material im industriellen Maßstab. Rao, „Preparation of Liposomes on the Industrial Scale: Problems and Perspectives" in LIPOSOME TECHNOLOGY, Vol. I, G. Gregordias, ed., (CRC Press, 1984) S. 247–257. In dem am weitesten verbreiteten von diesen wird ein dünner Lipidfilm (aus einem organischen Lösungsmittel) an den Wänden eines Behälters abgeschieden, eine wässrige Lösung des einzukapselnden Materials wird zugegeben und der Behälter wird geschüttelt. Bangham et al., J. Mol. Biol. 13: 238 (1965). Unter den richtigen Bedingungen resultiert dieses einfache Verfahren in der Bildung multilamellarer Vesikel aus Liposomen, welche das Material einschließen. Der Erfolg dieses Verfahrens beruht wesentlich auf der Bildung des dünnen Lipidfilms, und es wird eine Veränderlichkeit hinsichtlich der Einkapselung mit unterschiedlichen Schüttelverfahren beobachtet.

**[0007]** Das Belgische Patent Nr. 866697 beschreibt ein alternatives Verfahren, das nicht auf der Filmbildung beruht. In diesem Verfahren wird eine organische Lösung eines Lipids gefriergetrocknet, was ein lyophilisiertes Produkt mit physikalischen Eigenschaften ergibt, welche der einfachen Hydratation durch eine wässrige Lösung des einzukapselnden Materials förderlich sind.

**[0008]** Die Probleme, welche mit den bekannten Herstellungsverfahren zusammenhängen, schließen eine Variabilität zwischen Chargen hinsichtlich der Menge des in den Liposomen eingeschlossenen Materials (Einkapselungseffizienz), des Volumens des internen Einschlußraums pro Menge (mg oder  $\mu\text{mol}$ ) des Lipids, des mittleren Durchmessers einzelner Liposomen und eine Größenheterogenität ein. Mayhew et al., supra. Beispielsweise zeigt die Tabelle I in Conrad et al., Biochim. Biophys. Acta 332: 36–46 (1974), daß eine Standardabweichung der Einkapselungseffizienz von 12–13% innerhalb von 18 oder 8 unabhängig voneinander hergestellten Liposomenpräparationen festgestellt wurde. Es wird geschätzt, daß der Wertebereich zwischen einzelnen Präparationen um etwa 50% schwankte. Es wurde ein geringer Grad der Einkapselung und eine hohe Veränderlichkeit der Einkapselungseffizienz von Charge zu Charge unter sonst ähnlichen Bedingungen berichtet. Rao, supra.

**[0009]** Bisher wurden keine gewerblichen Verfahren entwickelt, welche zur Verminderung der Veränderlichkeit der Einkapselungseffizienz wirksam waren. Die hohe Veränderlichkeit der Einkapselungseffizienz weist nachteilige Konsequenzen hinsichtlich der Herstellung von Liposomenpräparationen für die Vakzin- oder Wirkstoffabgabe im großen Maßstab auf. Die Veränderlichkeit macht es so gut wie unmöglich, eine Gleichförmigkeit von Charge zu Charge sicherzustellen und es macht die Qualitätskontrolle schwierig.

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0010]** Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von Liposomenpräparationen bereitzustellen, wobei die Veränderlichkeit der Einkapselungseffizienz zwischen den Chargen vermindert ist.

**[0011]** Gemäß dieser Aufgabe wird unter einem Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Liposomenpräparation, die Liposomen umfaßt, welche ein eingekapseltes Material enthalten, bereitgestellt, wobei das Verfahren das Hydratisieren einer Lipid- oder Liposomenformulierung mit einer Lösung eines einzukapselnden Materials umfaßt, wobei die Verbesserung: (A) Bereitstellen einer Mehrzahl von Anteilen bzw. Portionen einer Lipid- oder Liposomenformulierung, (B) Hydratisieren jeder der Mehrzahl von Anteilen mit einer Lösung, die ein einzukapselndes Material umfaßt, und (C) Vereinigen jedes der Mehrzahl von Anteilen bzw. Portionen, um eine einzelne Liposomenpräparation zu bilden, umfaßt. Die Anteile können gewaschen werden, um Material, das nicht eingekapselt ist, zu entfernen, bevor sie vereinigt werden. Das einzukapselnde Material kann ein Antigen oder ein Wirkstoff sein, und die Präparation kann in einem Vakzin verwendet werden.

**[0012]** Unter einem weiteren Gesichtspunkt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Liposomenpräparation bereit, wobei das Liposom ein eingekapseltes Material enthält, umfassend die Schritte: (A) Bereitstellen einer Mehrzahl von Anteilen einer hydratisierten Liposomenformulierung, (B) Lyophilisieren jedes der Mehrzahl von Anteilen, (C) Hydratisieren jedes der Mehrzahl von Anteilen mit einer Lösung, die ein einzukapselndes Material enthält, und (D) Vereinigen jedes der Mehrzahl von Anteilen, um eine einzelne Liposomenpräparation zu bilden.

**[0013]** Unter einem weiteren Gesichtspunkt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Liposomenpräparation bereit, wobei das Liposom ein einzukapselndes Material enthält, umfassend die Schritte: (A) Bereitstellen einer Mehrzahl von Behältern, wobei jeder Behälter eine Lipid- oder Liposomenformulierung umfaßt, (B) Einbringen einer Lösung, die ein einzukapselndes Material umfaßt, in einen der Behälter, wodurch eine Liposomensuspension gebildet wird, (C) Einbringen einer zuvor hergestellten Liposomensuspension in einen anderen der Mehrzahl von Behältern und (D) Wiederholen von Schritt (C), um eine Liposomenpräparation zu bilden.

**[0014]** Weitere Ziele und Vorteile der Erfindung sind teilweise in der vorliegenden Beschreibung dargelegt und sind teilweise anhand der Beschreibung nahegelegt oder können durch Ausführung der Erfindung erlernt werden. Die Ziele und Vorteile können mit Hilfe der Verfahren und Zusammensetzungen, die in den angefügten Ansprüchen besonders hervorgehoben sind, realisiert und erhalten werden.

## Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0015]** [Fig. 1](#) zeigt die % der zugegebenen eingekapselten Glucose gegen die liposomale Phospholipidkonzentration, wenn Liposomenpräparationen gemäß bekannter Verfahren (•) und gemäß der vorliegenden Erfindung (■) hergestellt werden.

## Ausführliche Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

**[0016]** Es gibt viele mögliche Quellen für die Veränderlichkeit der Einkapselungseffizienz, welche bei der Herstellung von in Liposomen eingekapselten Materialien beobachtet wird. Beispielsweise können die Größe und Gestalt des zur Hydratation verwendeten Gefäßes, die Temperatur und Veränderungen in der Dicke des zur hydratisierenden getrockneten Lipidfilms zur Bestimmung der Einkapselungseffizienz einer gegebenen Charge beitragen. Die Veränderlichkeit kann ein kumulativer Effekt einiger oder aller dieser Bedingungen sein.

**[0017]** Die vorliegende Erfindung beruht auf der Prämisse, daß eine Hauptquelle der Veränderlichkeit zwischen Chargen bei der gewerblichen Herstellung von Liposomenpräparationen von der Veränderlichkeit beim Hydratationsschritt einzelner Chargen herrührt, was eine Veränderlichkeit zwischen den Chargen hinsichtlich der Menge des in den Liposomen eingeschlossenen Materials ergibt.

**[0018]** Um zu testen, ob die Veränderlichkeit bei diesem Schritt eine wichtige Determinante der Einkapselungseffizienz ist, wurde das folgende Experiment durchgeführt. Getrocknete Lipidfilme wurden mit absteigenden Volumen von 0,308 M Glucose gemäß bekannten Verfahren hydratisiert, um Liposomenpräparationen mit liposomalen Phospholipidkonzentrationen von 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM und 100 mM zu bilden.

• in [Fig. 1](#) zeigen die % zugegebener Glucose, die von den Liposomen eingeschlossen wurde, gegen die liposomale Phospholipidkonzentration bei diesem Verfahren. Es wurde eine direkte Beziehung bei liposomalen Phospholipidkonzentrationen von 0–40 mM beobachtet. Bei höheren liposomalen Phospholipidkonzentrationen weicht die Einkapselungseffizienz jedoch deutlich von der Kurve ab. Der Datenpunkt bei der Probe mit 100 mM ist zur Hervorhebung eingekreist.

**[0019]** Wenn eine 100 mM Präparation gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde, war die Einkapselungseffizienz vorhersagbarer. Insbesondere wurde eine 0,308 M Lösung von Glucose in einen Behälter gegeben, der einen trockenen Lipidfilm umfaßte, und der Behälter wurde geschüttelt, um die Lipide zu hydratisieren, was eine Suspension mit einer Phospholipidkonzentration von 10 mM ergab. Diese Suspension wurde in einen anderen Behälter gegeben, der einen trockenen Lipidfilm umfaßte, was eine Suspension mit einer Phospholipidkonzentration von 20 mM ergab. Dieses Verfahren wurde insgesamt zehnmal fortgeführt, was eine Liposomenendpräparation mit einer Konzentration von 100 mM ergab. Die % Glucose, welche in dieser Präparation eingeschlossen waren (s. ■ in [Fig. 1](#)), lagen im Bereich, welcher auf Grundlage der Daten von den Proben mit 0–40 mM, welche vorstehend besprochen wurden, vorhergesagt worden wäre.

**[0020]** Dieses Experiment bestätigte, daß ein hoher Grad der Veränderlichkeit zum Zeitpunkt der Hydratation eingeführt wird. Das erfindungsgemäße Verfahren umgeht dieses Problem und kann verwendet werden, um Liposomenpräparationen mit geringerer Variabilität hinsichtlich der Einkapselungseffizienz zwischen den Chargen herzustellen.

**[0021]** Im erfindungsgemäßen Verfahren wird eine Liposomenpräparation durch Hydratisieren einer Mehrzahl bzw. Vielzahl von Anteilen einer Lipid- oder Liposomenformulierung mit einer Lösung des einzukapselnden Materials und Vereinigen der Anteile hergestellt, um die Liposomenendpräparation zu bilden.

**[0022]** Das erfindungsgemäße Verfahren kann durch Anpassen jeglicher Verfahren zur Herstellung von Liposomen, einschließlich der vorstehend besprochenen, bekannten Verfahren, derart durchgeführt werden, daß (A) eine Mehrzahl von Anteilen einer Lipid- oder Liposomenformulierung bereitgestellt wird, (B) die Anteile mit einer Lösung eines einzukapselnden Materials hydratisiert werden und (C) die hydratisierten Anteile vereinigt werden, um die Liposomenendpräparation zu bilden.

**[0023]** Die Anteile können unabhängig voneinander hydratisiert und vereinigt werden, nachdem jeder Anteil hydratisiert worden ist, um die Endcharge der Liposomenpräparation zu bilden. Oder es wird in einer anderen Ausführungsform des Verfahrens ein erster Anteil hydratisiert, die resultierende Suspension wird verwendet, um den nächsten Anteil zu hydratisieren, die Suspension, welche aus dieser Hydratation resultiert, wird verwendet, um den nächsten Anteil zu hydratisieren, und dieses Verfahren wird wiederholt, bis alle Anteile hydratisiert sind, was in der Bildung einer Endcharge der Liposomenpräparation resultiert.

**[0024]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Herstellungsverfahren die folgenden Schritte: Es werden mehrfache bzw. vielfache Anteile einer „leeren“ wässrigen Liposomenformulierung (Suspension) bereitgestellt. Jeder Anteil bzw. jede Portion wird lyophilisiert und mit einer Lösung eines einzukapselnden Materials hydratisiert, was in der Bildung einer Mehrzahl von Anteilen von Liposomen, welche das Material eingeschlossen haben, resultiert. Diese Anteile werden dann vereinigt, um eine einzelne Charge zu bilden, welche die Liposomenendpräparation bildet. Jeder Anteil wird vor dem Vereinigen gewaschen, um nicht eingekapseltes Material zu entfernen.

**[0025]** In einer anderen Ausführungsform wird eine Mehrzahl von Anteilen einer organischen Lösung von Lipiden bereitgestellt, von denen jeder getrocknet und mit Wasser hydratisiert wird, um eine Mehrzahl „leerer“ Liposomenformulierungen zu bilden. Jeder Anteil wird lyophilisiert und mit einer Lösung des einzukapselnden Materials hydratisiert. Diese Anteile werden wiederum gewaschen, um nicht eingekapseltes Material zu entfernen. Dann werden alle Anteile in einem einzelnen Pool vereinigt, welcher die Liposomenendpräparation bildet.

**[0026]** In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens wird eine Mehrzahl von Anteilen einer lyophilisierten, leeren Liposomenformulierung bereitgestellt, beispielsweise durch Lyophilisieren einer leeren Liposomenformulierung und Aliquotieren des lyophilisierten Materials in eine Mehrzahl von Anteilen, oder durch Aliquotieren der Liposomenformulierung in Anteile vor der Lyophilisierung. Jeder lyophilisierte Anteil wird mit einer Lösung des einzukapselnden Materials hydratisiert und kann gewaschen werden, um nicht eingekapseltes Material zu entfernen. Dann werden alle Anteile in einem einzelnen Pool vereinigt, welcher die Liposomenendpräparation bildet.

**[0027]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird das Verfahren von Bangham et al., supra, erfindungsgemäß angepaßt. Beispielsweise wird eine Mehrzahl von Anteilen einer organischen Lösung von Lipiden in einer Mehrzahl von Behältern bereitgestellt, und die organischen Lösungsmittel werden aus jedem Anteil, z. B. durch Rotationsverdampfung, entfernt, was in der Bildung eines dünnen Lipidfilms auf den Wänden des Behälters resultiert. Es wird eine wässrige Lösung des einzukapselnden Materials zu jedem Anteil gegeben, und die Behälter werden geschüttelt, was in der Bildung einer Mehrzahl von Anteilen von Liposomen resultiert, welche das Material eingeschlossen haben. Diese Anteile werden dann vereinigt, um die Liposomenendpräparation zu bilden.

**[0028]** Bei einer weiteren Anpassung dieses Verfahrens wird eine Mehrzahl von Behältern bereitgestellt, wobei jeder einen dünnen Lipidfilm auf dessen Wänden aufweist. Es wird eine wässrige Lösung eines einzukapselnden Materials in einen der Behälter gegeben und der Behälter wird geschüttelt, um den Lipidfilm zu hydratisieren und eine Liposomensuspension zu bilden. Diese Suspension wird in einen weiteren Behälter gegeben, der geschüttelt wird, und die resultierende Suspension wird in einen weiteren Behälter gegeben. Dieses Verfahren wird wiederholt, bis alle Lipidfilme hydratisiert worden sind, was in der Bildung der Liposomenendpräparation resultiert.

**[0029]** Andere Verfahren zur Herstellung von Liposomenpräparationen gemäß der vorliegenden Erfindung sind einem Fachmann ersichtlich.

**[0030]** „Anteil bzw. Portion einer Lipid- oder Liposomenformulierung“ bedeutet erfindungsgemäß eine Menge einer Lipid- oder Liposomenformulierung. Der Anteil kann in jeglicher Form vorliegen, beispielsweise als Lösung, Suspension, Feststoff, Film oder lyophilisiertes Pulver. Eine Mehrzahl bzw. Vielzahl von Anteilen bedeutet mehr als einen Anteil. Es wird angenommen, daß mit der Bereitstellung von mindestens zwei Anteilen einer Lipid- oder Liposomenformulierung die Vorteile der vorliegenden Erfindung erreicht werden.

**[0031]** Die erfindungsgemäß bereitgestellte Mehrzahl von Anteilen kann in getrennten Behältern, wie Teströhrchen, Reaktionsgefäßen, Kolben oder anderen geeigneten Behältern, welche einem Fachmann ersichtlich sind, bereitgestellt werden. Eine Mehrzahl von Anteilen kann aus einer Mehrzahl von Lipid- oder Liposomenformulierungen erhalten werden. In einer anderen Ausführungsform kann eine Mehrzahl von Anteilen durch Aliquotieren einer einzelnen Lipid- oder Liposomenformulierung in einer Mehrzahl von Behältern hergestellt werden.

**[0032]** Die Anzahl von Anteilen der Lipid- oder Liposomenformulierung, welche bereitgestellt wird, ist in Abhängigkeit vom verfügbaren Ausgangsmaterial, der Endpräparation und der Laborbedingungen veränderlich. Wie vorstehend ausgeführt, wird ein Minimum von zwei Anteilen bereitgestellt. Die Anzahl und Größe der verfügbaren Gefäße, das verfügbare Volumen des einzukapselnden Materials, das Volumen der herzustellenden Liposomenendpräparation und die in der Endpräparation benötigte Phospholipidkonzentration können alle zur Entscheidung über die Anzahl der herzustellenden Anteile beitragen.

**[0033]** Falls eine Mehrzahl von Anteilen einer Liposomenformulierung zu lyophilisieren ist, ist es bevorzugt, daß das in jedes Gefäß zu gebende Volumen des Anteils etwa 8% bis etwa 12% des maximalen Fassungsvermögens des Gefäßes (z. B. betrüge bei einem 50 ml Gefäß das Liposomenaliquot 4–6 ml) beträgt. Die Verwendung größerer Volumen pro Gefäßfassungsvermögen kann eine unvorhersagbare, unvollständige Lyophilisierung ergeben. Die maximale Größe des Gefäßes kann durch die maximale Höhe des Gefäßes bestimmt werden, welches von dem bestimmten zu verwendenden Lyophilisiergerät aufgenommen werden kann.

**[0034]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden mindestens 10 Anteile der Lipid- oder Liposomenformulierung, ohne Ansehen weiterer Erwägungen, bereitgestellt. Es wurden auch Präparationen gemäß der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von 40 bis 60 Anteilen hergestellt, um eine Präparation mit einem Endvolumen von 100 bis 200 ml und einer Phospholipidkonzentration von 50 mM herzustellen.

**[0035]** Unter den meisten Umständen bestimmen praktische Erwägungen den oberen Grenzwert der Anzahl bereitgestellter Anteile. Falls beispielsweise die Anteile durch Zentrifugation zu waschen sind, kann die Anzahl verfügbarer Zentrifugen und das Fassungsvermögen der Röhrchen oder Flaschen, welche zur Zentrifugation verwendet werden, die Anzahl bereitgestellter Anteile bestimmen. Es wurde in Experimenten bisher innerhalb eines Tages eine einzelne Charge einer Liposomenpräparation durch Aufteilen einer einzelnen, leeren, wässrigen Liposomenformulierung in 200 Anteile, Lyophilisieren jedes Anteils, Hydratisieren jedes Anteils mit einer Lösung eines Antigens und Vereinigen der Anteile, um die Charge zu bilden, hergestellt. Es kann auch eine

größere Anzahl von Anteilen gemäß der vorliegenden Erfindung bereitgestellt werden.

**[0036]** Wie vorstehend ausgeführt, können die einzelnen Anteile der Liposomen, welche das einzukapselnde Material umfassen, gewaschen werden, bevor sie in der Endcharge vereinigt werden. Waschverfahren zum Entfernen von eingekapseltem Material sind einem Fachmann bekannt und variieren mit dem eingekapselten Material. Beispielsweise entfernt bei einigen Antigenen und Wirkstoffen die Reinigung durch Zentrifugation und Resuspendierung fast alles (95% oder mehr) des nicht eingekapselten Materials im ersten Waschschrift. In anderen Fällen ist ein zweites Waschen erforderlich, um mindestens eine 95%ige Entfernung des nicht-eingekapselten Materials zu erreichen.

**[0037]** Bei Materialien, die bei physiologischem pH unlöslich sind, werden die Lipid- oder Liposomenformulierungen mit einer Lösung des einzukapselnden Materials in einem Puffer bei dem für die Löslichkeit erforderlichen pH hydratisiert. Bei diesen Präparationen kann zu Beginn eine Waschung unter Verwendung des gleichen Puffers und pHs, wie für die Hydratation verwendet, durchgeführt werden, und es kann eine zweite Waschung unter Verwendung eines Puffers bei physiologischem pH durchgeführt werden. Die resultierenden Liposomenpellets können dann in einer Lösung des Puffers bei physiologischem pH zur Verwendung in der Endpräparation suspendiert werden.

**[0038]** Das einzukapselnde Material kann beispielsweise ein Antigen oder ein Wirkstoff sein. Es kann ein jegliches Antigen oder ein jeglicher Wirkstoff, einschließlich denjenigen, welche in Liposomen durch andere Verfahren eingekapselt worden sind, verwendet werden. Wassef et al. *Immunomethods* 4: 217–222 (1994), Alving et al. *AIDS Res. and Human Retroviruses* 10 (2): S91–S94 (1994). Es wurden beispielsweise zwei Malariaantigene, R32NSI<sub>81</sub> (SmithKline Beecham, SKF 105154) und NS1<sub>81</sub> RLF (SmithKline Beecham, SKF 107727), rekombinante Proteine, abgeleitet vom Circumsporozoitprotein der Sporozoitenform des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum*, in Liposomen gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung eingekapselt und in klinischen Studien verwendet. Fries et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Nr. 89: 358–362 (1992). Diese Vakzinformulierung war als Vakzinformulierung sehr erfolgreich und erzeugte hohe Antikörperspiegel gegen das Malariaantigen im Menschen.

**[0039]** Es wurde auch ein Antileishmania-Wirkstoff, Natriumstibogluconat (Pentostam<sup>®</sup>, Wellcome Foundation, Ltd.) in Liposomen gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung eingekapselt. Alving et al., „Preparation of Liposomes For Use As Drug Carriers in The Treatment of Leishmaniasis“ in *LIPOSOME TECHNOLOGY*, Vol. II, G. Gregordias, ed., (CRC Press, 1984) S. 55–68. Die ebenfalls anhängige U.S. Seriennummer (Zeichen des Anwalts Nr. 71007/119), deren Inhalt durch Bezugnahme eingefügt ist, beschreibt eine Liposomenpräparation, welche das HIV-Hüllprotein gp120 einkapselt. Diese Präparation kann gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt werden.

**[0040]** Die Endformulierung kann zur Verwendung als Vakzin oder Wirkstoffformulierung verpackt werden. Da die Einkapselungseffizienz von der Natur des einzukapselnden Materials, wie die Hydrophobizität und die Ladung des Antigens, abhängt, kann sie nicht für ein jegliches bestimmtes Antigen vorhergesagt werden. Die Lipidkonzentration in einer Vakzinformulierung muß daher empirisch gewonnen werden, falls eine bestimmte Dosis des Antigens pro Injektionsvolumen erwünscht ist.

**[0041]** Die Ausführungsformen der Erfindung können weiter durch Beispiele erläutert werden, welche die Gesichtspunkte der Erfindung im einzelnen zeigen. Diese Beispiele erläutern bestimmte Elemente der Erfindung und sind nicht zur Einschränkung ihres Schutzbereichs auszulegen.

Beispiel 1. Herstellungsprotokoll für liposomale R32NS1-Vakzine, enthaltend 1.000 µg MPL pro Dosis

**[0042]** Die Enddosierungsform wurde unter Verwendung keimfreier Vorkehrungen hergestellt. Alle Verfahren, welche organische Lösungsmittel einschlossen, wurden unter einem Abzug durchgeführt.

#### 1. Einbringen von Lipidlösungen in Verdampfungsgefäße

**[0043]** Es wurden sterile, pyrogenfreie 100 ml Meßzylinder (eingeteilt in 1 ml) verwendet, um die Lipidlösungen in einen sterilen, pyrogenfreien, säuregewaschenen Rundkolben mit einem Fassungsvermögen von 2 Litern zu geben, welcher einen 24/40 Mattglashals aufwies. Der Hals des Rundkolbens wurde mit Aluminiumfolie (welche verwendet wurde, um die Sterilität des Kolbens zu erhalten) bedeckt gehalten, außer wenn Lipidlösungen zugegeben wurden. Die Folie wurde direkt vor dem Einsetzen des Kolbens in den Rotationsverdampfer entfernt.

[0044] In den Kolben wurden gegeben:

Komponente	ml	mg
Cholesterin	85,0	4,930
Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) (Avanti Polar Lipids, Inc.)	85,0	10,370
Dimyristoylphosphatidylglycerin (DMPG) (Avanti Polar Lipids, Inc.)	85,0	1,173
Monophosphoryllipid A (3D-MPL), (Ribi ImmunoChem Research, Inc.)	85,0	680
Gesamt	340,0	17,153

## 2. Rotationsverdampfung der Lipidlösungen

[0045] Sofort nachdem die Lipidlösungen in den Rundkolben pipettiert wurden, wurde er in einen Rotationsverdampfer unter den folgenden Bedingungen eingesetzt:

Wasserbadtemperatur	40-45°C
Kühlerschlangen	Gekühlt mit laufendem Leitungswasser
Falle	Gekühlt in Eis
Winkel des rotierenden Kolbens	ca. 45°
Rotationsgeschwindigkeit	Steuerung anfangs auf 2 eingestellt, auf 1 vermindert, wenn Lipidlösung sehr viskos.
Vakuumpumpe	Anfangs auf Meßablesung von 200 mbar eingestellt, dann auf 100 mbar erhöht, wenn keine Blasenbildung auftrat.

[0046] Der Kolben wurde mit dem Verdampfer durch eine sterile Glasfalle verbunden, um einen Rückfluß von kondensiertem Lösungsmittel zurück in den Kolben zu verhindern. Die Rotation wurde fortgeführt, bis das gesamte Lösungsmittel verdampft war und ein dünner Lipidfilm auf dem Glas zurückblieb. Sobald er getrocknet war (ca. 1 Stunde), wurde der Kolben aus dem Verdampfer entfernt. Sofort nach dem Entfernen wurde die Öffnung des Kolbens mit sterilem Whatman #541-Filterpapier bedeckt, welches mit einem Gummiband an seinem Platz gehalten wurde, in einen Exsikkator gestellt und weiter unter Hochvakuum (10 mbar) über Nacht getrocknet, um jegliche Lösungsmittelsuren zu entfernen. Nach dem Trocknen über Nacht wurde der Exsikkator unter Vakuum verschlossen und bei 4-6°C bis zur Hydratation des Lipidfilms gehalten bzw. aufbewahrt.

## 3. Hydratation des Lipidfilms

[0047] Der Exsikkator wurde unter eine Sterilbank verbracht, geöffnet und der den getrockneten Lipidfilm enthaltende Kolben wurde dem Exsikkator entnommen. Das den Hals des Rundkolbens bedeckende Filterpapier wurde durch einen sterilen Mattglasstopfen ersetzt. Es wurden 385 ml steriles, pyrogenfreies Wasser für die Injektion (USP) in den Rundkolben unter Verwendung steriler Pipetten gegeben. Der Mattglasstopfen wurde wieder eingesetzt und der Kolben wurde kräftig mit der Hand geschüttelt, bis das gesamte Lipid von der Kolbenwand entfernt wurde. Die Phospholipidkonzentration an diesem Punkt, bezogen auf das anfangs zugegebene Phospholipid und das Hydratationsvolumen, betrug ungefähr 45 mM. Der Kolben mit den hydratisierten Liposomen wurde bei 4-6°C gelagert, bis die Liposomen zur Lyophilisierung in Flaschen abgefüllt wurden.

## 4. Einbringen von hydratisierten Liposomen in Lyophilisierungsbehälter

[0048] Der Kolben mit den hydratisierten Liposomen wurde dekontaminiert und in einen Reinraum überführt. Nachdem der Inhalt des Kolbens auf Raumtemperatur gebracht wurde, wurden die Liposomen kräftig geschüttelt, um eine homogene Suspension sicherzustellen, und es wurde eine Probe für die Sterilitätsprüfung ent-

nommen. Es wurden 7,0 ml hydratisierte Liposomen in jede von 16 sterilen Vakzinflaschen (60 ml Fassungsvermögen) pipettiert. Es wurden graue Schlitzstopfen halb in die Flaschen eingesetzt. Die Flaschen wurden in die Lyophilisiergerätkammer (welche sich direkt zum Reinraum öffnete) gestellt, die Kammer wurde geschlossen und die Flaschen wurden bei  $-40^{\circ}\text{C}$  bis zu 8 Stunden gehalten, um den Inhalt einzufrieren.

#### 5. Lyophilisierung

**[0049]** Der Gefriertrocknungszyklus wurde bei  $-40^{\circ}\text{C}$  begonnen. Die Temperatur wurde dann auf  $10^{\circ}\text{C}$  bei einer Geschwindigkeit von  $2,5^{\circ}/\text{Stunde}$  erhöht. Das Produkt wurde bei  $10^{\circ}\text{C}$  für 12–36 Stunden gehalten, dann wurde die Temperatur auf  $20^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Wenn der Gefriertrocknungszyklus vollständig war, wurden die Flaschen aus dem Lyophilisiergerät entfernt (im Reinraum), die Stopfen wurden vollständig eingesetzt und es wurden Aluminiumabdichtungen an jeder Flasche angebracht. Die Flaschen wurden in eine steril abgedeckte Wanne bzw. Schale gestellt und dann aus dem Reinraum überführt und bei  $4-6^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln gelagert.

#### 6. Rekonstitution lyophilisierter Liposomen mit Antigen

**[0050]** R32NS1-Antigen (SKF 105154 Charge #U-90055-Z1A, JFM 16843-59) wurde als 190 ml Lösung mit  $4,2\text{ mg/ml}$  in Acetatpuffer, pH 5,5, erhalten. Diese Lösung wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter Verwendung eines Spectraporschlauchs (M. W.-Ausschlußgrenze 3.500), welcher zuvor in 0,2% Di-Natrium-EDTA für 60 Minuten gekocht wurde, gegen 12 Liter PBS, pH 6,5, für 3–6 Stunden dialysiert. Nach der Dialyse wurde die R32NS1-Lösung durch Filtration durch einen  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  Filter in einer Sterilbank sterilisiert. Die filtrierte R32NS1-Lösung wurde bei  $4-6^{\circ}\text{C}$  gelagert, bis sie verwendet wurde, um lyophilisierte Liposomen zu rekonstituieren.

**[0051]** Die Wanne mit den lyophilisierten Liposomen wurde in eine Sterilbank überführt. Die Mitte jeder Aluminiumabdichtung wurde entfernt und es wurden  $1,5\text{ ml}$  der mittels Filtration sterilisierten, dialysierten R32NS1-Lösung (ungefähr  $4,2\text{ mg/ml}$ ) mit Hilfe einer Spritze in jede Flasche gegeben, um eine ungefähre Phospholipidkonzentration von  $200\text{ mM}$  zu ergeben. Die Fläschchen wurden sanft geschüttelt, um sicherzustellen, daß die lyophilisierten Liposomen vollständig benetzt waren, in die abgedeckte Wanne zurückgestellt, aus der Bank entfernt und bei  $4-6^{\circ}\text{C}$  für 18–72 Stunden gelagert, um eine vollständige Rekonstitution zu erlauben.

#### 7. Entfernen von nicht eingekapseltem R32NS1

**[0052]** Die Wanne mit den rekonstituierten Liposomen wurde dekontaminiert und in den Reinraum überführt. Wenn die Liposomen Raumtemperatur erreichten und alles Lipid suspendiert war (keine Klumpen von getrocknetem Lipid), wurden die Aluminiumabdichtungen von den Flaschen entfernt, und es wurden  $25\text{ ml}$  durch Filtration sterilisierte Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Hilfe einer sterilen Pipette in jede Flasche gegeben. Die verdünnten Liposomen wurden in 46 sterile Polycarbonat-Schraubdeckelzentrifugenröhrchen ( $35\text{ ml}$  Fassungsvermögen) überführt. Die Zentrifugenröhrchen (12 auf einmal) wurden in einen sterilen SA-600-Rotor gesetzt und der Rotor wurde verschlossen. Der Rotor wurde aus dem Reinraum entfernt und in eine gekühlte Sorvall RC2b-Hochgeschwindigkeitszentrifuge gesetzt. Die Liposomen wurden für 20 Minuten bei  $14.000\text{ UpM}$  (ca.  $30.000 \times g$ ) bei  $20-25^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Rotor wurde aus der Zentrifuge ohne Aufschütteln des Pellets entfernt, dekontaminiert und in den Reinraum überführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden aus dem Rotor genommen, und die Überstandsfraktion wurde unter Verwendung einer sterilen Pasteurpipette, welche über eine sterile Leitung an einen sterilen 2 Liter-Vakuumkolben, verbunden mit einer Vakuumleitung, verbunden war, entfernt. Dies wurde wiederholt, bis alle Röhrchen zentrifugiert waren.

#### 8. Resuspension gewaschener Liposomen

**[0053]** Nachdem die Überstandsfraktion entfernt worden war, wurden  $1,5\text{ ml}$  durch Filtration sterilisierte Phosphat-gepufferte Salzlösung in jedes Zentrifugenröhrchen gegeben, und die Liposomenpellets wurden durch Schütteln von Hand suspendiert. Die resuspendierten Liposomen wurden mit einer Pipette in einen sterilen  $52\text{ ml}$  Meßzylinder überführt. Jedes der Zentrifugenröhrchen wurde mit weiteren  $1,0\text{ ml}$  Phosphat-gepufferte Salzlösung gespült und die Spüllösung ebenfalls in den Meßzylinder überführt. Es wurde Phosphat-gepufferte Salzlösung zu dem gesammelten Liposomenpellet gegeben, um ein vereinigttes Endvolumen von  $185\text{ ml}$  zu ergeben. Es wurden Proben zur Bestimmung der losen bzw. groben Sterilität (engl. Ausdruck „bulk sterility“) und der Antigeneinkapselung entnommen.



## 9. Füllen der Endbehälter

**[0054]** Das Liposomenvakzin wurde unter keimfreien Vorkehrungen (das Abfüllen wurde in einem Reinraum der Klasse 100 durchgeführt) in 153 5 ml Vakzinflaschen mit 1,0 ml pro Flasche abgefüllt. Die Flaschen wurden mit Stopfen versehen, mit Aluminiumkappen verschlossen, markiert und bei 4–6°C gelagert. Es wurden Proben zum Testen der Endsterilität, Sicherheit, Pyrogenität und Wirksamkeit und zur Bestimmung der Antigeneinkapselung entnommen.

Beispiel 2. Herstellungsprotokoll für liposomale R32NS1-Vakzine, enthaltend 100 µg MPL pro Dosis

**[0055]** Die Dosierungsendform wurde unter Verwendung keimfreier Vorkehrungen hergestellt. Alle Verfahren, welche organische Lösungsmittel einschlossen, wurden unter einem Abzug durchgeführt.

## 1. Einbringen von Lipidlösungen in Verdampfungsgefäße

**[0056]** Es wurden sterile Glaspipetten (10 ml Fassungsvermögen, eingeteilt in 1/10 ml) und sterile, pyrogenfreie 100 ml Meßzylinder (eingeteilt in 1 ml) verwendet, um die Lipidlösungen in einen sterilen, säuregewaschenen Rundkolben mit 2 Liter Fassungsvermögen, welcher einen 24/40 Mattglashals aufwies, zu geben. Der Hals des Rundkolbens wurde mit Aluminiumfolie (die zum Erhalten der Sterilität des Kolbens verwendet wurde) abgedeckt gehalten, außer wenn Lipidlösungen dazugegeben wurden. Die Folie wurde direkt vor dem Einsetzen des Kolbens in den Rotationsverdampfer entfernt.

**[0057]** In den Kolben wurden pipettiert:

Komponente	ml	mg
Cholesterin	85,0	4,930
Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) (Avanti Polar Lipids, Inc.)	85,0	10,370
Dimyristoylphosphatidylglycerin (DMPG) (Avanti Polar Lipids, Inc.)	85,0	1,173
Monophosphorylipid A (3D-MPL) (Ribi ImmunoChem Research, Inc.)	8,5	68
Gesamt	263,5	16,541

## 2. Rotationsverdampfung der Lipidlösungen

**[0058]** Sofort nachdem die Lipidlösungen in den Rundkolben pipettiert worden waren, wurde er in einen Rotationsverdampfer unter den folgenden Bedingungen eingesetzt:

Wasserbadtemperatur	40-45°C
Kühlerschlangen	Gekühlt mit laufendem Leitungswasser
Falle	Gekühlt in Eis
Winkel des rotierenden Kolbens	ca. 45°
Rotationsgeschwindigkeit	Steuerung anfangs auf 2 eingestellt, auf 1 vermindert, wenn Lipidlösung sehr viskos.
Vakuumpumpe	Anfangs auf Meßablesung von 200 mbar eingestellt, dann auf 100 mbar erhöht, wenn keine Blasenbildung auftrat.

**[0059]** Der Kolben wurde mit dem Verdampfer über eine sterile Glasfalle verbunden, um einen Rückfluß von

kondensiertem Lösungsmittel zurück in den Kolben zu verhindern. Die Rotation wurde fortgeführt, bis sämtliches Lösungsmittel verdampft war und ein dünner Lipidfilm auf dem Glas zurückblieb. Sobald er getrocknet war (ca. 1 Stunde), wurde der Kolben aus dem Verdampfer entfernt. Sofort nach dem Entfernen wurde die Öffnung des Kolbens mit sterilem Whatman #541-Filterpapier bedeckt und in einen Exsikkator gestellt und weiter unter Hochvakuum (10 mbar) über Nacht getrocknet, um jegliche Spuren von Lösungsmittel zu entfernen. Nach dem Trocknen über Nacht wurde der Exsikkator unter Vakuum verschlossen und bei 4–6°C bis zur Hydratation des Lipidfilms aufbewahrt.

### 3. Hydratation des Lipidfilms

**[0060]** Der Exsikkator wurde in eine Sterilbank überführt, geöffnet und der Kolben, welcher den getrockneten Lipidfilm enthielt, aus dem Exsikkator entnommen. Das den Hals des Rundkolbens bedeckende Filterpapier wurde durch einen sterilen Mattglasstopfen ersetzt. Es wurden 385 ml steriles, pyrogenfreies Wasser zur Injektion (USP) in den Rundkolben unter Verwendung steriler Pipetten gegeben. Der Mattglasstopfen wurde wieder eingesetzt und der Kolben wurde kräftig von Hand geschüttelt, bis das gesamte Lipid von der Kolbenwand entfernt war. Die Phospholipidkonzentration an diesem Punkt, bezogen auf das anfänglich zugegebene Phospholipid und das Hydratationsvolumen, betrug ungefähr 44 mM. Der Kolben mit den hydratisierten Liposomen wurde bei 4–6°C gelagert, bis die Liposomen zur Lyophilisierung in Flaschen abgefüllt wurden.

### 4. Einbringen hydratisierter Liposomen in Lyophilisierungsbehälter

**[0061]** Der Kolben mit den hydratisierten Liposomen wurde dekontaminiert und in einen Reinraum überführt. Nachdem der Inhalt des Kolbens auf Raumtemperatur gebracht worden war, wurden die Liposomen kräftig geschüttelt, um eine homogene Suspension sicherzustellen, und es wurde eine Probe zur Sterilitätsprüfung entnommen. Es wurden 7,0 ml hydratisierte Liposomen in jede von 58 sterilen Vakzinflaschen (60 ml Fassungsvermögen) pipettiert. Es wurden graue Schlitzstopfen halb in die Flaschen eingesetzt. Die Flaschen wurden in die Lyophilisiergerätkammer (welche sich nur zum Reinraum öffnete) gestellt, die Kammer geschlossen und die Flaschen wurden für bis zu 8 Stunden bei –40°C gehalten, um den Inhalt einzufrieren.

### 5. Lyophilisierung

**[0062]** Der Gefriertrocknungszyklus wurde bei –40°C begonnen. Die Temperatur wurde dann auf 10°C bei einer Geschwindigkeit von 2,5°/Stunde erhöht. Das Produkt wurde bei 10°C für 12–36 Stunden gehalten, dann wurde die Temperatur auf 20°C eingestellt. Wenn der Gefriertrocknungszyklus vollständig war, wurden die Flaschen aus dem Lyophilisiergerät entfernt (im Reinraum), die Stopfen wurden vollständig eingesetzt, und es wurden Aluminiumabdichtungen an jeder Flasche angebracht. Die Flaschen wurden in eine steril abgedeckte Wanne gestellt und dann aus dem Reinraum überführt und bei 4–6°C im Dunkeln gelagert.

### 6. Rekonstitution lyophilisierter Liposomen mit Antigen

**[0063]** Die Wanne mit den lyophilisierten Liposomen wurde in eine Sterilbank überführt. Die Mitte jeder Aluminiumabdichtung wurde entfernt und es wurden 1,5 ml der durch Filtration sterilisierten R32NS1-Lösung (ca. 4,2 mg/ml, hergestellt wie im vorstehenden Beispiel 1) mit einer Spritze in jede Flasche gegeben, um eine ungefähre Phospholipidkonzentration von 200 mM zu ergeben. Die Fläschchen wurden sanft geschüttelt, um sicherzustellen, daß die lyophilisierten Liposomen vollständig benetzt waren, in die steril abgedeckte Wanne zurückgestellt, aus der Bank entfernt und bei 4–6°C für 18–72 Stunden gelagert, um eine vollständige Rekonstitution zu erlauben.

### 7. Entfernen von nicht eingekapseltem R32NS1

**[0064]** Die Wanne mit den rekonstituierten Liposomen wurde dekontaminiert und in den Reinraum überführt. Wenn die Liposomen Raumtemperatur erreichten und sämtliches Lipid suspendiert war (keine Klumpen von getrocknetem Lipid), wurden die Aluminiumabdichtungen von den Flaschen entfernt, und es wurden 25 ml durch Filtration sterilisierte Phosphat-gepufferte Salzlösung mit einer sterilen Pipette in jede Flasche gegeben. Die verdünnten Liposomen wurden in 46 sterile Polycarbonat-Schraubkappenzentrifugenröhrchen (35 ml Fassungsvermögen) überführt. Die Zentrifugenröhrchen (12 auf einmal) wurden in einen sterilen SA-600-Rotor gesetzt und der Rotor verschlossen. Der Rotor wurde aus dem Reinraum entfernt und in eine gekühlte Sorvall RC2b-Hochgeschwindigkeitszentrifuge eingesetzt. Die Liposomen wurden für 20 Minuten bei 14.000 Upm (ca. 30.000 × g) bei 20–25°C zentrifugiert. Der Rotor wurde aus der Zentrifuge entfernt, ohne das Pellet aufzuschüttern, dekontaminiert und in den Reinraum überführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden aus dem Rotor entfernt

und die Überstandsfraktion wurde unter Verwendung einer sterilen Pasteurpipette, welche über eine sterile Schlauchleitung an einen sterilen 4 Liter Vakuumkolben, der mit einer Vakuumleitung verbunden war, angeschlossen war, entfernt. Dies wurde wiederholt, bis alle Röhrchen zentrifugiert worden waren.

#### 8. Resuspension gewaschener Liposomen

**[0065]** Nachdem die Überstandsfraktion entfernt worden war, wurden 1,5 ml filtrierte, sterilisierte Phosphat-gepufferte Salzlösung in jedes Zentrifugenröhrchen gegeben, und die Liposomenpellets wurden mit Schütteln von Hand resuspendiert. Die suspendierten Liposomen wurden mit einer Pipette in einen sterilen 250 ml Meßzylinder überführt. Jedes der Zentrifugenröhrchen wurde mit zusätzlichen 1,0 ml steriler Phosphat-gepuffertes Salzlösung gespült, und die Spüllösung wurde ebenfalls in den Meßzylinder überführt. Es wurde sterile Phosphat-gepufferte Salzlösung zu den gesammelten Liposomenpellets gegeben, um ein vereinigt Endvolumen von 180 ml zu ergeben. Es wurden Proben zur Bestimmung der groben Sterilität und der Antigeneinkapselung entnommen.

#### 9. Füllen der Endbehälter

**[0066]** Das Liposomenvakzin wurde unter Verwendung keimfreier Vorkehrungen (das Abfüllen wurde in einem Reinraum durchgeführt) in 147 5 ml Vakzinflaschen mit 1,0 ml pro Flasche abgefüllt. Die Flaschen wurden mit Stopfen versehen, mit Aluminiumkappen abgedichtet, markiert und bei 4–6°C gelagert. Es wurden Proben zum Testen der Endsterilität, Sicherheit, Pyrogenizität und Wirksamkeit und zur Bestimmung der Antigeneinkapselung entnommen.

#### Beispiel 3. Einkapselungseffizienz von Liposomenpräparationen der Beispiele 1 und 2

**[0067]** Die zwei Liposomenchargen, enthaltend R32NS1, welche in den vorstehenden Beispielen 1 und 2 hergestellt wurden, wurden analysiert, um die Veränderlichkeit hinsichtlich der Einkapselungseffizienz zwischen den Chargen zu bestimmen. Es wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

#### Einkapselung von R32NS1 in klinischen Chargen liposomaler Malariavakzine

Beispiel 1	20,3 %
Beispiel 2	18,7 %
Durchschnitt ( $\pm$ S.D.)	19,5 $\pm$ 1,1
Abweichung vom Durchschnitt	$\pm$ 0,8 %

**[0068]** Diese Daten zeigen, daß die Veränderlichkeit hinsichtlich der Einkapselungseffizienz von R32NS1 in den zwei Chargen mit einer Abweichung von im Durchschnitt nur  $\pm$ 0,8% sehr klein war. Dies stellt einen deutlichen Vorteil gegenüber der von Conrad et al., supra, berichteten Abweichung von 12–13% dar.

**[0069]** Es ist einem Fachmann ersichtlich, daß verschiedene Modifikationen und Variationen bei den Verfahren und Zusammensetzungen dieser Erfindung durchgeführt werden können. Daher ist es beabsichtigt, daß die vorliegende Erfindung die Modifikationen und Veränderungen dieser Erfindung einschließt, vorausgesetzt, daß sie im Schutzbereich der beigefügten Ansprüche und ihrer Äquivalente liegen.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Liposomenpräparation, die Liposomen umfaßt, welche ein eingekapseltes Material enthalten, wobei das Verfahren das Hydratisieren einer Lipid- oder Liposomenformulierung mit einer Lösung eines einzukapselnden Materials,

(A) das Bereitstellen einer Lipid- oder Liposomenformulierung,

(B) das Teilen der Lipid- oder Liposomenformulierung in eine Mehrzahl von Anteilen,

(C) das Hydratisieren jeder der Mehrzahl von Anteilen mit einer Lösung, die ein einzukapselndes Material umfaßt, und

(D) das Vereinigen jedes der Mehrzahl von Anteilen, um eine einzelne Liposomenpräparation zu bilden, umfaßt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, das nach Schritt (C) und vor Schritt (D) weiter den Schritt des Waschens

jedes der Mehrzahl von Anteilen umfaßt, um Material, das nicht eingekapselt ist, zu entfernen.

3. Verfahren zur Herstellung einer Liposomenpräparation, wobei das Liposom ein eingekapseltes Material enthält, umfassend die Schritte:

- (A) Bereitstellen einer Lipid- oder Liposomenformulierung,
- (B) Teilen der Lipid- oder Liposomenformulierung in eine Mehrzahl von Anteilen,
- (C) Lyophilisieren jedes der Mehrzahl von Anteilen,
- (D) Hydratisieren jedes der Mehrzahl von Anteilen mit einer Lösung, die ein einzukapselndes Material umfaßt, und
- (E) Vereinigen jedes der Mehrzahl von Anteilen, um eine einzelne Liposomenpräparation zu bilden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, das nach Schritt (D) und vor Schritt (E) weiter den Schritt des Waschens jedes der Mehrzahl von Anteilen umfaßt, um Material, das nicht eingekapselt wurde, zu entfernen.

5. Verfahren nach Anspruch 2 oder Anspruch 4, wobei das Waschen das Zentrifugieren jedes der Mehrzahl von Anteilen umfaßt, um Pellets zu bilden und die Pellets zu resuspendieren.

6. Verfahren zur Herstellung einer Liposomenpräparation, wobei das Liposom ein eingekapseltes Material enthält, umfassend die Schritte:

- (A) Bereitstellen einer Lipid- oder Liposomenformulierung,
- (B) Teilen der Lipid- oder Liposomenformulierung in eine Mehrzahl von Behältern,
- (C) Einbringen einer Lösung, die ein einzukapselndes Material umfaßt, in einen der Mehrzahl von Behältern, wodurch eine Liposomensuspension gebildet wird,
- (D) Einbringen einer zuvor hergestellten Liposomensuspension in einen anderen der Mehrzahl von Behältern, und
- (E) Wiederholen von Schritt (D), um eine Liposomenpräparation zu bilden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei jeder der Behälter einen trockenen Lipidfilm umfaßt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Material ein Antigen, wie das HIV-Antigen gp120 oder eines der Malariaantigene R32NS1<sub>81</sub> und NS1<sub>81</sub>RLF, oder ein Arzneistoff, wie Natriumstibogluconat, ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Präparation in einem Vakzin verwendet wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei mindestens 2 Anteile oder Behälter, vorzugsweise mindestens 10 Anteile oder Behälter, am meisten bevorzugt 40 bis 60 Anteile oder Behälter oder mindestens 200 Anteile oder Behälter der Lipid- oder Liposomenformulierung bereitgestellt werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Formulierung von Schritt (A) eine Lipidformulierung ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Formulierung von Schritt (A) eine Liposomenformulierung ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

FIG. 1

