(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. April 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/026282 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: A61K 9/127, 49/00, 31/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010163

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. September 2003 (12.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 42 367.9 12. September 2002 (12.09.2002) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.** [DE/DE]; Hofgartenstrasse 8, 80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **EIBL, Hansjörg** [DE/DE]; Heinrich-Deppe-Ring 22, 37120 Bovenden (DE). **LINDNER, Lars, H.** [DE/DE]; Pelargonienweg 62, 81377 München (DE).

(74) Anwälte: **WEICKMANN, Franz, Albert** usw.; Weickmann & Weickmann, Postfach 860 820, 81635 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:
— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/026282 A1

(54) **Title:** THERMOLABILE LIPOSOME WITH A CONTROLLED RELEASE TEMPERATURE

(54) **Bezeichnung:** THERMOLABILES LIPOSOM MIT GEREGELTER FREIGABETEMPERATUR

(57) **Abstract:** The invention relates to a thermolabile liposome with a controlled release temperature for the liposome content, especially a liposome which is stable in serum at 37°C and has a controlled release temperature of between 40 and 80°C.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein thermolabiles Liposom mit geregelter Freigabetemperatur für den Liposomeninhalt, insbesondere ein bei 37°C in Serum stabiles Liposom mit einer geregelten Freigabetemperatur zwischen 40 und 80°C.

Thermolabiles Liposom mit geregelter Freigabetemperatur

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein thermolabiles Liposom mit geregelter Freigabetemperatur für den Liposomeninhalt, insbesondere ein bei 37 °C in Serum stabiles Liposom mit einer geregelten Freigabetemperatur zwischen 40 und 80 °C.

Liposomen sind künstlich gebildete Vesikel aus Lipiddoppelschichten, welche ein wässriges Kompartiment einschließen (Bangham et al., 1965). Ursprünglich noch als Modellsystem für eine Zellmembran genutzt, wurden Liposomen in jüngster Zeit vor allem für den Arzneistofftransport weiterentwickelt. Liposomen können dabei die Verträglichkeit von Wirkstoffen steigern (Senkung der aktiven Toxizität von Amphothericin B durch liposomale Formulierung (AmBisome®) um den Faktor 75 (Proffitt et al., 1991)). Sie eröffnen aber auch die Möglichkeit, Arzneistoffe gezielt in erkranktes Gewebe zu transportieren (Forssen et al., 1992). Nach intravenöser Applikation werden Liposomen hauptsächlich in Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) der Leber und Milz aufgenommen (Gregoriadis und Nerunhun, 1974). Um Liposomen als Arzneistoffträger für Zellen außerhalb des RES nutzen zu können, versuchte man die Zirkulationszeit der Liposomen im Blut zu erhöhen. Vor allem in Tumoren, die häufig sehr gut vaskularisiert sind (Jain, 1996) und deren Gefäße durch geweitete interendotheliale Verbindungen, eine große Anzahl von Fenestrierungen sowie diskontinuierliche Basalmembranen (Murray and Carmichael, 1995) besonders durchlässig sind, würde sich die Aufnahmewahrscheinlichkeit von Liposomen dadurch massiv erhöhen.

Ein erstes Problem bei der Verwendung von Liposomen zum Transport von Wirkstoffen oder Markierungsstoffen in Körperflüssigkeiten liegt daher in

der Erhöhung der Zirkulationszeit im Serum. Man hat zwar bereits gefunden, dass durch kovalente Bindung von Methoxypolyethylenglykolen an die Liposomenmembran die frühzeitige Erkennung der Liposomen durch das RES verhindert wird und damit die Zirkulationszeit der Liposomen verbessert werden kann. Neben einer Verbesserung der Zirkulationszeit besteht jedoch auch ein großes Interesse an einer Möglichkeit, durch Temperatureinwirkung eine gezielte Freigabe der Liposomeninhaltsstoffe bei bestimmter Temperatur zu erreichen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Liposom bereitzustellen, welches eine wesentlich verbesserte Halbwertszeit im Serum aufweist, verglichen mit der üblichen Halbwertszeit bekannter Liposomen in der Größenordnung um 4 Stunden, und welches so beschaffen ist, dass der Inhalt der Liposomen bei einer bestimmten Temperatur rasch freigesetzt wird.

Gelöst wird diese Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung durch ein Liposom mit geregelter Freigabetemperatur für den Liposomeninhalt, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es im Wesentlichen aus mindestens einem Phosphatidylcholin mit einer Hauptumwandlungstemperatur im Bereich von 0 bis 80 °C und mehr als 15 bis 70 Gew.-% Phosphatidyloligoglycerin gebildet ist. Gemäß einem älteren Vorschlag war es lediglich möglich, Liposomen mit einem maximalen Phosphatidyloligoglycerin-Gehlt von 15 Gew.-% zu erhalten. Nunmehr wurde jedoch überrschenderweise gefunden, dass es möglich ist, den Phosphatidyloligoglyceringehalt bis zu 70 % zu erhöhen, sodass der Bereich der erzielbaren Freigabetemperaturen der Liposomen noch mehr erweitert wird, aber vor allem die Halbwertszeiten nochmals verbessert werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die erfindungsgemäßen Liposomen zusätzlich geringere Mengen an

Alkylphosphocholinen, vorzugsweise 10 bis 15 Gew.-%. Geeignete Substanzen sind z.B. Hexadecylphosphocholin, Oleylphosphocholin sowie Etherlysolecithine. Bei den Etherlysolecithinen kann die Hydroxylgruppe in Position 2 des Glycerins methyliert oder frei vorliegen. Bei dieser Ausführungsform gelingt es, die Freisetzung der im Liposom eingeschlossenen Substanzen von etwa 70 % ohne den Gehalt an Alkylphosphocholin auf praktisch 100 % zu erhöhen, was auf eine Beschleunigung der Liposomenöffnung zurückzuführen ist. Des Weiteren weisen die Alkylphosphocholine einen antitumoralen Effekt durch temperaturabhängige Freisetzung aus den Liposomen auf.

Erfindungsgemäß aufgebaute Liposomen weisen wesentlich verbesserte Halbwertszeiten von bis zu mehr als 25 Stunden im Serum auf und können durch geeignete Wahl der Komponenten und Mengen der Komponenten in Abhängigkeit von deren Hauptumwandlungstemperatur den (oder die) Inhaltsstoff(e) bei einer vorbestimmten Temperatur rasch und vollständig freigeben.

Bevorzugt ist das erfindungsgemäße Liposom aus etwa 20 bis 75 Gew.-% Dipalmitoyllecithin (1,2-Dipalmitoylglycero-3-phosphocholin), etwa 10 bis 25 Gew.-% Distearoyllecithin (1,2-Distearoylglycero-3-phosphocholin) und mehr als 15 bis etwa 50 Gew.-% Dipalmitoylphosphoglyceroglycerin zusammengesetzt. Eine solche bevorzugte Zusammensetzung ist bei 37 °C im Serum stabil, gibt jedoch den Inhalt bei Überschreiten einer Temperatur von 40 °C rasch frei.

Eine weitere bevorzugte Zusammensetzung mit verbesserter Freigabe der im Liposom eingeschlossenen Substanzen besteht aus etwa 15 bis 70 Gew.-% Dipalmitoyllecithin, etwa 10 bis 25 Gew.-% Distearoyllecithin und mehr als 15 bis etwa 45 Gew.-% Dipalmitoylphosphoglyceroglycerin.

Die vorstehend genannte bevorzugte Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Liposoms lässt sich für andere Temperaturbereiche maßschneidern durch Wahl von Komponenten mit der jeweils geeigneten Hauptumwandlungstemperatur. In Tabelle 1 sind die Hauptumwandlungstemperaturen (T_M) von Phosphatidylcholinen angegeben, deren Hauptumwandlungstemperaturen im Bereich von 0 bis 80 °C liegen. Die Hauptumwandlungstemperaturen sind wie aus der Tabelle erkennbar, abhängig von der Kettenlänge und der Verteilung über die Positionen 1 und 2 von Glycero-3-phosphocholin oder über die Positionen 1 und 3 von Glycero-2-phosphocholin.

Tabelle 1

T_M	Phosphatidylcholin
5 °C	1-Palmitoyl-2-oleoyl-
7 °C	1-Stearoyl-2-oleoyl-
11 °C	1-Palmitoyl-2-lauroyl-
14 °C	1-Behenoyl-2-oleoyl-
17 °C	1-Stearoyl-2-lauroyl-
19 °C	1,3-Dimyristoyl-
23 °C	1,2-Dimyristoyl-
27 °C	1-Palmitoyl-2-myristoyl-
33 °C	1-Stearoyl-2-myristoyl-
37 °C	1-Myristoyl-2-palmitoyl-
39 °C	1,3-Dipalmitoyl-
41 °C	1,2-Dipalmitoyl-
42 °C	1-Myristoyl-2-stearoyl-
46 °C	1-Stearoyl-3-myristoyl-
48 °C	1-Stearoyl-2-palmitoyl-
52 °C	1-Palmitoyl-2-stearoyl-
53 °C	1,3-Distearoyl-
56 °C	1,2-Distearoyl-
66 °C	1,2-Diarachinoyl-
75 °C	1,2-Dibehenoyl-
80 °C	1,2-Dilignoceroyl-

Die in der Tabelle 1 aufgeführten Werte zeigen, dass durch Verwendung von Fettsäuren mit ungerader Kettenlänge und geeigneter Verteilung über das Glyceringrundgerüst praktisch jede gewünschte Temperatur im angegebenen Bereich von 0 bis 80 °C eingestellt werden kann.

Der Gehalt an Phosphatidyloligoglycerinen im erfindungsgemäßen Liposom ist essenziell für die erforderliche lange Zirkulationszeit im Serum. Phosphatidyloligoglycerine und ihre Herstellung sind bekannt aus der DE 196 22 224. Bevorzugt wird Dipalmitoylphosphoglyceroglycerin (DPPG2) verwendet.

Die erfindungsgemäßen thermolabilen Liposomen eignen sich hervorragend für die Anwendung auf verschiedenen Gebieten, insbesondere aber im Rahmen der regionalen Tiefenhyperthermie. Die regionale Tiefenhyperthermie, die in Kombination mit systemischer Chemotherapie an spezialisierten klinischen Zentren angewendet wird, bietet sich als ideale Technik für den tumorspezifischen liposomalen Transport und die anschließende Freisetzung eines Arzneistoffs aus der liposomalen Hülle an. So fördert die Hyperthermie zum einen die Extravasation von Liposomen aus Tumorkapillaren in das Interstitium (Gaber et al., 1996). Zum anderen kann durch die Erwärmung eine Freisetzung des Arzneistoffs aus speziellen thermosensitiven Liposomen induziert werden (Magin und Niesman, 1984). Zusätzlich gibt es zahlreiche Hinweise für einen gesteigerten zytotoxischen Effekt von Zytostatika (Hahn et al., 1975) sowie einer Immunmodulation (Aktivierung von NK-Zellen; Multhoff et al., 1999) durch regionale Tiefenhyperthermie.

Die Thermolabilität der erfindungsgemäßen Liposomen wird durch die Phasenumwandlung der Phospholipide innerhalb der Liposomenmembran bedingt. Wird die Phasenumwandlungstemperatur durchlaufen, so kommt es zu einer kurzzeitigen Membraninstabilität und anschließenden Freisetzung des liposomalen Inhalts.

Bei der oben erwähnten regionalen Hyperthermie wird der Tumor regional spezifisch überwärmt, sodass die Temperatur über der Grenztemperatur zur Freisetzung des Liposomeninhalts ansteigt. Als Liposomeninhalt kommen hierbei insbesondere in der Onkologie anwendbare Wirkstoffe, wie z.B.

Zytostatika, in Betracht. Jedoch können auch Kontrastmittel, beispielsweise Gadolinium, z.B. Magnevist®, Multihance® oder Omniscan®, Carboxyfluorescein, jodhaltige Kontrastmittel, die sích von Pyridinen oder aromatischen Carbonsäuren ableiten, o.dgl. allein oder zusammen mit einem Wirkstoff zur Freisetzung gebracht werden. Die temperaturabhängige Freisetzung von Gadolinium aus den Liposomen lässt sich durch eine veränderte T1-Zeit mit Hilfe eines MRT darstellen (0,2 bzw. 1,5 Teslar). Durch Verwendung von Kontrastmitteln, wie Gadolinium, wird eine nicht invasive Thermometrie möglich gemacht, bei der die erreichte Temperatur durch MRC bestimmt werden kann, die das freigesetzte Gadolinium misst. Bei dieser Anwendung der erfindungsgemäßen Liposomen wird zweckmäßig ein Hyperthermiegerät mit einem MRC-Gerät gekoppelt angewendet. Eine Verwendung von Liposomen mit jodhaltigem Kontrastmittel für die Darstellung in der Computertomographie (beispielsweise für die Thermoablation von Lebermetastasen) ist auch denkbar.

Eine weitere Anwendungsart für die erfindungsgemäßen Liposomen findet sich in der Augenheilkunde. Bei Einkapselung einer fluoreszierenden Markierungssubstanz lässt sich z.B. bei einer Laserbehandlung durch Freisetzung des fluoreszierenden Wirkstoffes, wie z.B. Carboxyfluorescein, nachweisen, wo die angestrebte Überwärmung tatsächlich aufgetreten ist.

Analog zu der am Auge erläuterten Einsatzmöglichkeit können daher erfindungsgemäße Liposomen generell dazu verwendet werden, erreichte Temperaturen nachträglich bestimmbar zu machen, z.B. wenn bestimmte Erhitzungstemperaturen o.dgl. festgestellt werden sollen.

Die erfindungsgemäßen Liposomen bestehen im Wesentlichen aus den oben angegebenen Substanzen, die bevorzugt in reiner Form vorliegen. Verunreinigungen sollten möglichst gering gehalten werden, insbesondere sollte ein möglichst geringer Cholesteringehalt vorliegen. Bevorzugt werden

Liposomen, die völlig frei von Cholesterin sind, da Cholesterin zu einer Verschmierung der Phasenumwandlungstemperatur führt und damit zu einem zu breiten thermischen Übergangsbereich.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen thermolabilen Liposomen erfolgt in üblicher Weise durch Auflösen der Lipide, z.B. in Chloroform oder Chloroform/Wasser/Isopropanol, Abziehen des Lösungsmittels, zweckmäßig im Vakuum im Rotationsverdampfer, Tempern der Lipide mit wässrigen Lösungen der einzukapselnden Inhaltsstoffe bei Temperaturen, die über der Phasenumwandlungstemperatur liegen. Die Dauer dieser Temperungsbehandlung beträgt zweckmäßig 30 bis 60 Minuten, kann jedoch aber auch kürzer oder länger sein. Durch mehrfach wiederholte Einfrier-Auftau-Vorgänge, beispielsweise 2- bis 5-faches Einfrieren und wieder Auftauen, erfolgt eine Homogenisierung. Schließlich wird die erhaltene Lipidsuspension durch eine Membran definierter Porengröße bei einer Temperatur über der Phasenumwandlungstemperatur extrudiert, um die angestrebte Liposomengröße zu erreichen. Als Membran eignen sich beispielsweise Polycarbonatmembranen definierter Porengröße, wie 100 bis 200 nm. Schließlich kann gegebenenfalls nicht eingekapselter Inhaltsstoff abgetrennt werden, beispielsweise durch Säulenchromatographie o.dgl.

Die folgenden Abbildungen und Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

Abbildung 1 zeigt die erhaltenen Werte der in vitro CF-Freisetzung aus thermolabilen Liposomen.

Liposomenzusammensetzung:

DPPG:DSOC:DPPG2 = 3:2:5

Große Stabilität in Gegenwart von Serum bei 37 C (CF-Freisetzung nach 18 Stunden < 7 %).

Abbildung 2 zeigt die Beeinflussung der Freisetzungstemperatur von $DDPG_2$/DSPC/DPPC-Liposomen durch Variation des Anteils des DSPC auf Kosten von DPPC.

Abbildung 3 zeigt die Verbesserung der CF-Freisetzung aus $DPDG_2$/DSPC/DPPC-Liposomen durch Erhöhung des Anteils an $DPPG_2$ auf Kosten von DPPC (konstanter Anteil an DSPC mit 20 %).

Abbildung 4 zeigt die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) von Liposomen aus 30 Gew.-% $DPPG_2$, 20 Gew.-% DSPC und 50 Gew.-% DPPC (mittlere Größe: 175 nm).

Beispiel 1

a) In der oben beschriebenen Weise werden die in der Tabelle 2 aufgeführten Liposomen hergestellt.

Tabelle 2

$DPPG_2$ 30 %	DSPC 0 %	DPPC 70 %	
$DPPG_2$ 30 %	DSPC 10 %	DPPC 60 %	
$DPPG_2$ 30 %	DSPC 20 %	DPPC 50 %	
$DPPG_2$ 30 %	DSPC 30 %	DPPC 40 %	
$DPPG_2$ 10 %	DSPC 0 %	DPPC 90 %	
$DPPG_2$ 10 %	DSPC 10 %	DPPC 80 %	
$DPPG_2$ 10 %	DSPC 20 %	DPPC 70 %	
$DPPG_2$ 10 %	DSPC 30 %	DPPC 60 %	
$DPPG_2$ 0 %	DSPC 20 %	DPPC 80 %	
$DPPG_2$ 10 %	DSPC 20 %	DPPC 70 %	
$DPPG_2$ 20 %	DSPC 20 %	DPPC 60 %	
$DPPG_2$ 30 %	DSPC 20 %	DPPC 50 %	
$DPPG_2$ 40 %	DSPC 20 %	DPPC 40 %	
$DPPG_2$ 50 %	DSPC 20 %	DPPC 30 %	
$DPPG_2$ 80 %	DSPC 20 %	DPPC 0 %	
$DSPG_2$ 10 %		DPPC 90 %	
$DSPG_2$ 20 %		DPPC 80 %	
$DSPG_2$ 30 %		DPPC 70 %	
$DSPG_3$ 10 %		DPPC 90 %	
$DSPG_3$ 20 %		DPPC 80 %	
$DPPG_2$ 30 %	DSPC 20 %	DPPC 40 %	1PPC 10 %
$DPPG_2$ 30 %	DSPC 20 %	DPPC 30 %	1PPC 20 %
$DSPG_2$ 20 %		DPPC 70 %	1SPC 10 %
$DSPG_2$ 20 %		DPPC 60 %	1SPC 20 %
$DSPG_2$ 20 %		DPPC 70 %	Hexadecyl-PC 10 %
$DSPG_2$ 20 %		DPPC 60 %	Hexadecyl-PC 20 %
$DSPG_2$ 20 %		DPPC 70 %	Octadecyl-PC 10 %
$DSPG_2$ 20 %		DPPC 60 %	Octadecyl-PC 20 %
$DSPG_2$ 10 %		DPPC 80 %	Et-18 OCH_3PC 10 %
$DSPG_2$ 10 %		DPPC 70 %	Et-18 OCH_3PC 20 %
$DSPG_2$ 10 %		DPPC 60 %	Et-18 OCH_3PC 30 %

Abkürzungen:

DDPC =	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSPC =	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
$DPPG_2$ =	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-diglycerin
$DSPG_2$ =	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-diglycerin
$DSPG_3$ =	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-triglycerin
1PPC =	1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
1SPC =	1-Stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
Et-18 OCH_3PC =	1-Octadecyl-2-methyl-glycero-3-phosphocholin

Sie enthalten eingekapseltes Carboxyfluorescein. Freies Carboxyfluorescein wurde vorher durch Säulenchromatographie mit Sephadex G75 abgetrennt.

b) Chamber Modell:

Zur intravitalmikroskopischen Detektion der Caroxyfluorescein (CF)-Freisetzung aus thermolabilen Liposomen im Hyperthermiefeld eignet sich das Chambermodell des syrischen Hamsters (A-Mel-3-Melanom des syrischen Hamsters). Hierbei wird einem syrischen Goldhamster eine transparente, dorsale Hautkammer implantiert. Nach Implantation der Hautkammer erfolgt die Implantation von Zellen des A-Mel-3-Melanoms des Hamsters auf das in der Kammer befindliche Subkutangewebe. Innerhalb von wenigen Tagen wächst innerhalb der Rückenhaut des Hamsters ein Tumor von mehreren Millimeter Größe. Die Mikrozirkulation sowie die Fluoreszenzanreicherung innerhalb des Tumors kann mit einem modifizierten Vitalmikroskop beobachtet werden. Die Tiere erhalten zusätzlich einen zentralen Venenkatheter. Mit Hilfe eines unter der Hautkammer befindlichen Wärmetauschers kann lokal eine Erwärmung des Tumors auf 42 °C erreicht werden. Die Tumortemperatur kann mit Hilfe einer Temperatursonde direkt gemessen werden (Endrich, 1988).

Neben der Vitalmikroskopie ist auch das Verfahren der MRT-Messung am Chamber-Modell etabliert (Pahernik et al., 1999). Hierbei können analog zur Mikroskopie MRT-Bilder aufgenommen werden.

Die erhaltenen Werte der in vitro CF-Freisetzung sind in Abbildung 1 gezeigt. Ferner ist die Beeinflussung der Freisetzungstemperatur von $DPPG_2$/DSPC/DPPC-Liposomen durch Variation des Anteils an DSPC auf Kosten von DPPC in Abbildung 2 gezeigt. Die Verbesserung der CF-Freisetzung aus $DPPG_2$/DSPC/DPPC-Liposomen durch Erhöhung des Anteils an $DPPG_2$ auf Kosten von DPPC (konstanter Anteil an DSPC mit 20 %) ist in Abbildung 3 gezeigt. Überdies ist eine Photonenkorrelationsspektroskopie von $DPPG_2$/DSPC/DPPC-Liposomen in Abbildung 4 gezeigt.

Ansprüche

1. Thermolabiles Liposom mit geregelter Freigabetemperatur für den Liposomeninhalt,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass es im Wesentlichen aus mindestens einem Phosphatidylcholin mit einer Hauptumwandlungstemperatur im Bereich von 0 bis 80 °C und mehr als 15 bis 70 Gew.-% Phosphatidyloligoglycerin gebildet ist.

2. Liposom nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass es mindestens ein Phosphatidylcholin, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 1-Palmitoyl-2-olioylglycero-3-phosphocholin, 1-Stearoyl-2-olioyl-3-phosphocholin, 1-Palmitoyl-2-lauroylglycero-3-phosphocholin, 1-Behenoyl-2-olioylglycero-3-phosphocholin, 1-Stearoyl-2-lauroylglycero-3-phosphocholin, 1,3-Dimyristoylglycero-2-phosphocholin, 1,2-Dimyristoylglycero-3-phosphocholin, 1-Palmitoyl-2-myristoylglycero-3-phosphocholin, 1-Stearoyl-2-myristoylglycero-3-phosphocholin, 1-Myristoyl-2-palmitoylglycero-3-phosphocholin, 1,3-Palmitoylglycero-2-phosphocholin, 1,2-Dipalmitoylglycero-3-phosphocholin, 1-Myristoyl-2-stearoylglycero-3-phosphocholin, 1-Stearoyl-3-myristoylglycero-2-phosphocholin, 1-Stearoyl-2-palmitoylglycero-3-phosphocholin, 1-Palmitoyl-2-stearoylglycero-3-phosphocholin, 1,3-Distearoylglycero-2-phoshocholin, 1,2-Distearoylglycero-3-phosphocholin, 1,2-Diarachinoylglycero-3-phosphocholin, 1,2-Dibehenoylglycero-3-phosphocholin und 1,2-Dilignoceroylglycero-3-phosphocholin, enthält.

3. Liposom nach Anspruch 1 oder 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass es als Phosphatidyloligoglycerin Dipalmitoylphosphoglyceroglycerin enthält.

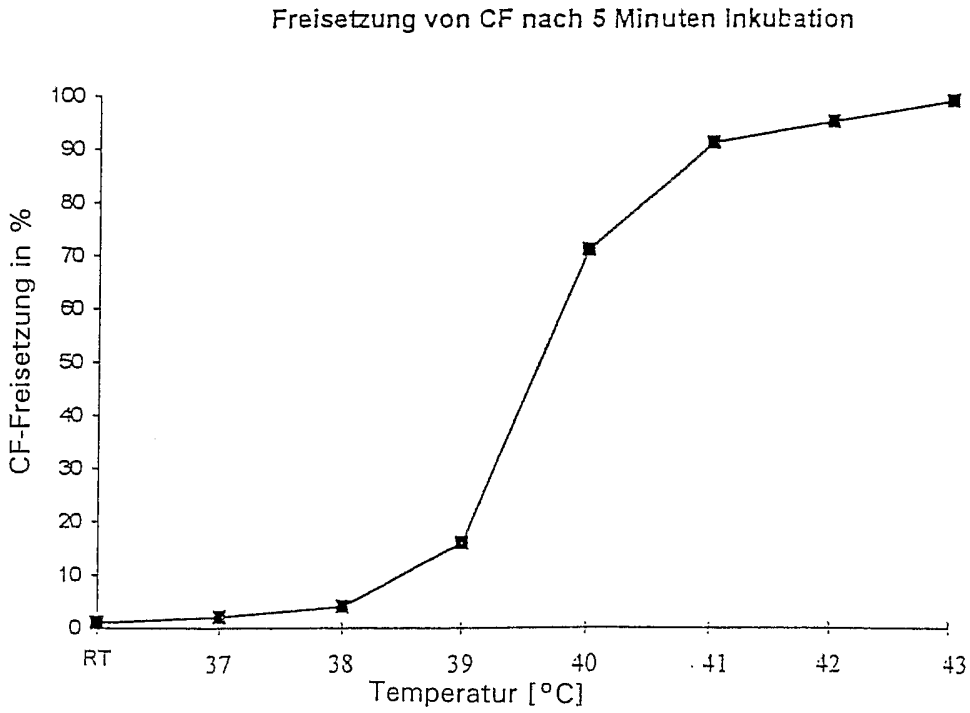
4. Liposom nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es im Wesentlichen aus 20 bis 75 % Dipalmitoyllecithin (DPPC), 10 bis 25 % Distearoyllecithin (DSPC) und mehr als 15 bis 50 % Dipalmitoylphosphoglyceroglycerin (DPPG2) besteht.

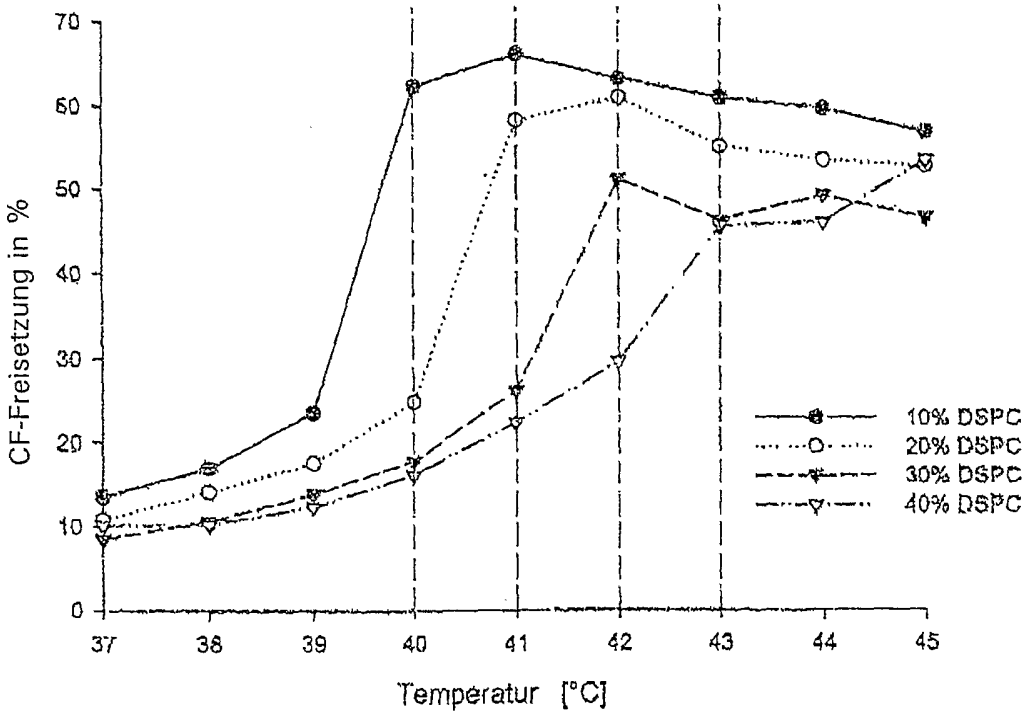
5. Liposom nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich bis 15 % mindestens eines Alkylphosphocholins enthält.

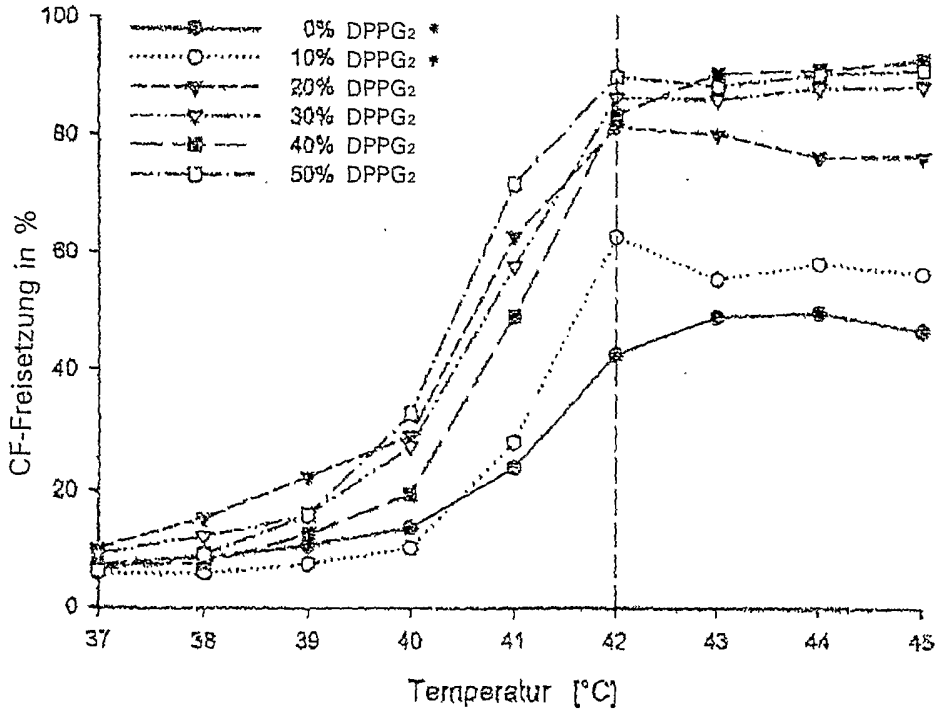
6. Liposom nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass es 10 bis 15 % mindestens einer der Verbindungen Hexadecylphosphocholin, Oleoylphosphocholin oder Etherlysolecithin enthält.

7. Liposom nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es kein Cholesterin enthält.

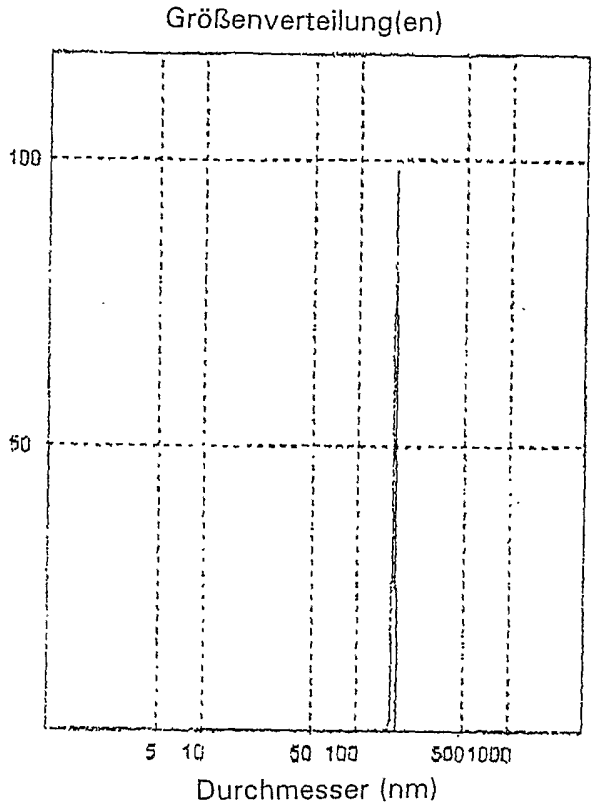
8. Liposom nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Wirkstoff oder/und eine Markierungssubstanz enthält.


Freisetzung von CF nach 5 Minuten Inkubation
CF-Freisetzung in %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
RT
37
38
39
40
41
42
43
Temperatur [°C]


CF-Freisetzung in %
70
60
50
40
30
20
10
0
37
38
39
40
41
42
43
44
45
Temperatur [°C]
10% DSPC
20% DSPC
30% DSPC
40% DSPC



* ≙ Vergleichsbeispiel


Größenverteilung(en)
100
50
5
10
50
100
500
1000
Durchmesser (nm)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/10163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/127 A61K49/00 A61K31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/064116 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; EIBL HANSJOERG (DE); LINDNER LARS (DE)) 22 August 2002 (2002-08-22) the whole document claims 2,3,5,6 p.8 figure and last paragraph: "DPPG:DSPG:DPPG-G2 = 7:2:1"	1
X	DE 196 22 224 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 21 August 1997 (1997-08-21) the whole document page 18, line 11 claim 11	1-3,5-8

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 February 2004	02/03/2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Luangkhot, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/10163

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARUYAMA K ET AL: "PHOSPHATIDYL POLYGLYCEROLS PROLONG LIPOSOME CIRCULATION IN VIVO" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, SWETS & ZEITLINGER, LISSE, NL, vol. 111, 1994, pages 103-107, XP000672277 ISSN: 0925-1618 the whole document abstract figure 1; table 1	1-3,5-8
X	WHITEMAN, K.; MACKIE, S.; LEVCHENKO, T.; HOFFMANN, P.; TORCHILIN, V.: "Long-circulating liposomes with phosphatidyl-(oligo)-glycerols" PROCEEDINGS - 28TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS, CONTROLLED RELEASE SOCIETY, no. 28, 23 June 2001 (2001-06-23), pages 466-467, XP0009025848 the whole document	1-3,5-8
P,X	WO 03/026617 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; EIBL JOERG (DE)) 3 April 2003 (2003-04-03) page 16, lines 9-12; example 3 the whole document claim 12	1-3,5-8
P,X	LEHNERT, RENE; EIBL, HANS-JOERG; MUELLER, KLAUS: "FT-IR and NMR Studies on the Conformational and Structural Properties of 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidyloligoglycerols" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, vol. 107, no. 1, 2003, pages 75-85, XP0009025885 This article was published on the web on 12/10/2002, which is between the priority date and filing date of present application. the whole document	1-3,5-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/10163

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02064116 A	22-08-2002	DE 10107165 A1	29-08-2002
		CA 2442698 A1	22-08-2002
		WO 02064116 A2	22-08-2002
		EP 1359901 A2	12-11-2003
DE 19622224 A	21-08-1997	DE 19622224 A1	21-08-1997
		AT 244254 T	15-07-2003
		AU 715208 B2	20-01-2000
		AU 1791297 A	02-09-1997
		CA 2246568 A1	21-08-1997
		DE 19735776 A1	25-02-1999
		DE 59710376 D1	07-08-2003
		DK 880530 T3	27-10-2003
		WO 9730058 A1	21-08-1997
		EP 0880530 A1	02-12-1998
		JP 2000506121 T	23-05-2000
		US 2003053978 A1	20-03-2003
		US 6413543 B1	02-07-2002
		US 2002090383 A1	11-07-2002
WO 03026617 A	03-04-2003	DE 10148065 A1	17-04-2003
		WO 03026617 A2	03-04-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/10163

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K9/127 A61K49/00 A61K31/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02/064116 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; EIBL HANSJOERG (DE); LINDNER LARS (DE)) 22. August 2002 (2002-08-22) das ganze Dokument Ansprüche 2,3,5,6 p.8 figure and last paragraph: "DPPG:DSPG:DPPG-G2 = 7:2:1"	1
X	DE 196 22 224 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 21. August 1997 (1997-08-21) das ganze Dokument Seite 18, Zeile 11 Anspruch 11	1-3,5-8

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
23. Februar 2004	02/03/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Luangkhot, N

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MARUYAMA K ET AL: "PHOSPHATIDYL POLYGLYCEROLS PROLONG LIPOSOME CIRCULATION IN VIVO" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, SWETS & ZEITLINGER, LISSE, NL, Bd. 111, 1994, Seiten 103-107, XP000672277 ISSN: 0925-1618 das ganze Dokument Zusammenfassung Abbildung 1; Tabelle 1	1-3,5-8
X	WHITEMAN, K.; MACKIE, S.; LEVCHENKO, T.; HOFFMANN, P.; TORCHILIN, V.: "Long-circulating liposomes with phosphatidyl-(oligo)-glycerols" PROCEEDINGS - 28TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS, CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Nr. 28, 23. Juni 2001 (2001-06-23), Seiten 466-467, XP0009025848 das ganze Dokument	1-3,5-8
P,X	WO 03/026617 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; EIBL JOERG (DE)) 3. April 2003 (2003-04-03) Seite 16, Zeilen 9-12; Beispiel 3 das ganze Dokument Anspruch 12	1-3,5-8
P,X	LEHNERT, RENE; EIBL, HANS-JOERG; MUELLER, KLAUS: "FT-IR and NMR Studies on the Conformational and Structural Properties of 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidyloligoglycerols" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, Bd. 107, Nr. 1, 2003, Seiten 75-85, XP0009025885 This article was published on the web on 12/10/2002, which is between the priority date and filing date of present application. das ganze Dokument	1-3,5-8

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 02064116	A	22-08-2002	DE	10107165 A1	29-08-2002
			CA	2442698 A1	22-08-2002
			WO	02064116 A2	22-08-2002
			EP	1359901 A2	12-11-2003
DE 19622224	A	21-08-1997	DE	19622224 A1	21-08-1997
			AT	244254 T	15-07-2003
			AU	715208 B2	20-01-2000
			AU	1791297 A	02-09-1997
			CA	2246568 A1	21-08-1997
			DE	19735776 A1	25-02-1999
			DE	59710376 D1	07-08-2003
			DK	880530 T3	27-10-2003
			WO	9730058 A1	21-08-1997
			EP	0880530 A1	02-12-1998
			JP	2000506121 T	23-05-2000
			US	2003053978 A1	20-03-2003
			US	6413543 B1	02-07-2002
			US	2002090383 A1	11-07-2002
WO 03026617	A	03-04-2003	DE	10148065 A1	17-04-2003
			WO	03026617 A2	03-04-2003