



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl. 3: A 61 K 49/04
A 61 K 9/52
A 61 K 37/22

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

641 682

⑫① Gesuchsnummer: 10333/78

⑦③ Inhaber:
Felix Daeniker, Feldmeilen

⑫② Anmeldungsdatum: 05.10.1978

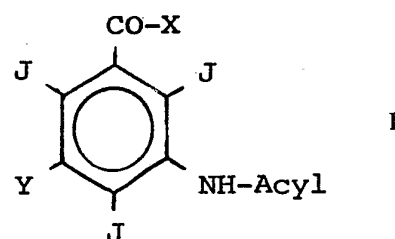
⑫④ Patent erteilt: 15.03.1984

⑫⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.03.1984

⑦② Erfinder:
Erfinder hat auf Nennung verzichtet

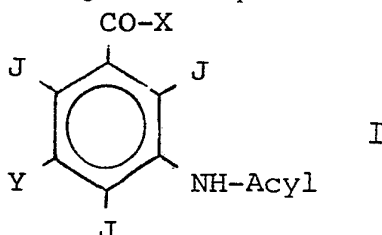
⑤④ **Röntgenkontrastmittel.**

⑤⑦ Das Röntgenkontrastmittel zur Darstellung insbesondere der Leber und der Milz besteht aus mindestens einer hochverträglichen schattengebenden Komponente der Formel I, worin Acyl einen ein- oder zweiwertigen Acylrest, Y Wasserstoff, eine Acylamino-, N-Alkyl-acylamino, Alkylaminocarbonyl- oder Hydroxyalkylaminocarbonyl-Gruppe und X eine OH- Gruppe oder deren Salze bedeutet, eingebettet in sphärischen Liposomen aus Phospholipiden mit Multilayer-Struktur.



PATENTANSPRÜCHE

1. Röntgenkontrastmittel zur Darstellung insbesondere der Leber und der Milz, bestehend aus mindestens einer hochverträglichen schattengebenden Komponente der Formel I



worin Acyl einen ein- oder zweiwertigen Acylrest, Y Wasserstoff, eine Acylamino-, N-Alkyl-acylamino, Alkylaminocarbonyl- oder Hydroxyalkylaminocarbonyl-Gruppe und X eine OH-Gruppe oder deren Salze bedeutet, eingebettet in sphärischen Liposomen aus Phospholipiden mit Multilayer-Struktur.

2. Röntgenkontrastmittel nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als schattengebende Komponente der Formel I 3,5-Bis-(acetylamino)-2,4,6-trijod-benzoesäure oder 5-Acetamido-2,4,6-trijod-N-methylisophthalamidsäure bzw. deren Salze verwendet.

3. Röntgenkontrastmittel nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als schattengebende Komponenten der Formel I Adipinsäure-bis-(3-carboxy-2,4,6-trijod-anilid), Diglykolsäure-bis(3-carboxy-2,4,6-trijod-anilid) oder 5,5'-(Adipoyldiamino)-bis-(2,4,6-trijod-N-methylisophthalamidsäure) bzw. deren Salze verwendet.

4. Verfahren zur Herstellung von Röntgenkontrastmitteln gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Phospholipid in einer konzentrierten Salzlösung der schattengebenden Komponente der Formel I gemäss Anspruch 1 dispergiert und daraus Liposome mit Multilayer-Struktur formt.

Die röntgenologische Kontrastdarstellung der Leber ist ein altes Anliegen des Arztes. Trotzdem gibt es bis heute dazu kein brauchbares Kontrastmittel.

Die Hepato-Lienographie, d. h. die positive Kontrastuntersuchung der Leber und Milz auf indirektem Wege durch intravenöse Injektion eines Kontrastmittels wurde früher mit Thorotrast, später mit Jodsolen vorgenommen. Wegen der schädigenden Wirkung dieser Kontrastmittel, die nicht mehr oder nicht genügend rasch ausgeschieden werden, wird diese Untersuchung nur noch im Experiment durchgeführt. (Barke Röntgenkontrastmittel, s. 266, Georg Thieme-Verlag, Leipzig, 1970).

Darstellungen der Leber mit Hilfe von Ultraschall-Echoverfahren, wie sie neuerdings vorgeschlagen werden, geben keine diagnostisch ausreichende Informationen.

Es stellt sich demnach das Problem wie man gut verträgliche Röntgenkontrastmittel, wie sie z. B. die intravenös anwendbaren hochverträglichen modernen Urographie- und Vasographiemittel Amidotrizoat, Acidum Ioxotrizoicum, Metrizoat, Acidum Iotalamicum, Acidum Ioxitalamicum, Acidum Ioglicicum, Acidum Ioxaglicum und Acidum Iocarmicum oder die Cholestographiemittel Adipidon, Acidum Ioglycamicum, Acidum Iotroxicum und Acidum Iosefamicum darstellen, präparieren kann, dass sie zur Darstellung der Leber und Milz verwendbar werden.

Es wurde z. B. versucht, Emulsionen oder Suspensionen

von Estern von oben genannten Kontrastmittelsäuren als Hepato-Lienographiemittel zu verwenden. Jedoch erwies sich einerseits die Stabilität von Emulsionen und Suspensionen im allgemeinen als ungenügend und andererseits der Metabolismus der Kontrastmittellester zu langsam, um eine für die klinische Anwendung ausreichende Sicherheit dieser diagnostischen Methode zu erreichen.

Es ist bekannt, dass sich Liposome aus Phospholipiden nach intravenöser Injektion bevorzugt in der Leber und Milz konzentrieren.

Liposome sind aus sphärischen bzw. polysphärischen Phospholipiden gebildete Mikrokapseln, deren Kern bzw. Zwischenräume Wirkstoffe oder Indikatoren enthalten können, die im Organismus nur langsam freigesetzt werden. Liposome haben im allgemeinen Abmessungen, die in der Grössenordnung roter Blutkörperchen liegen und demzufolge intravenös injizierbar sind. Da sie aus natürlichem Material bestehen oder in natürliche Komponenten metabolisieren, werden Liposome geeigneter Grösse vom Organismus im allgemeinen gut vertragen. Vergleich dazu beispielsweise DE-OS 2 725 696 (22.12.77). Ölembolien oder Thrombosen wie bei Jodölen sind jedenfalls hier nicht zu befürchten.

Dank der langsamen Freisetzung der Kontrastsubstanz treten auch keine Calcium-Entzugserscheinungen auf.

Parallel zu der Verbesserung der Technik der Liposome entwickelte sich auch ein zunehmendes Interesse für die Verwendung von Liposomen als Träger für Wirkstoffe und Enzyme und auch als immunologische Hilfsstoffe. DE-OS 2 532 317 (29.1.76), DE-OS 2 712 031 (29.9.77), DE-OS 2 643 641 (14.4.77). Ihre allgemeine Struktur ist einigermaßen bekannt. Es handelt sich z. B. um zwiebelartige Strukturen, die eine Reihe von Lipidschichten aufweisen, d. h. um Kügelchen, die eine wässrige Flüssigkeit, welche Wirkstoffe enthalten kann, umschliessen. Liposome werden gewöhnlich in isotonischen wässrigen Medien, insbesondere physiologischer Kochsalzlösung (0,9 Gew.-% NaCl), kolloid dispergiert.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Idee zu Grunde, hochverträgliche schattengebende Komponenten, die sich als Röntgenkontrastmittel bereits bestens bewährt haben, in Liposome einzubetten und derart Präparate zu schaffen, die nach intravenöser Verabreichung bevorzugt in Leber und Milz konzentriert werden.

Es wurde nun gefunden, dass insbesondere Salze der hochverträglichen stark sauren Kontrastmittelsäuren, wie sie in den modernen intravenös anwendbaren Urographie-, Gefäss- und Cholecystographiemitteln verwendet werden, mit Phospholipiden nach an sich bekannten Verfahren zu Liposomen verarbeitet werden können, die sich ihrerseits intravenös verabreichen lassen. Es wurde weiter gefunden, dass wenige Minuten nach intravenöser Verabreichung dieser Liposome im Röntgenkontrastbild die Leber und Milz erkennbar wird. Die quantitative Ausmessung der Leber/Milz-Kontraste kann auch mit Hilfe der Tomographie erfolgen, einer Methode, die es ermöglicht, auch feine Differenzen quantitativ zu erfassen und diagnostisch auszuwerten.

Gewöhnlich sind bereits einige Stunden nach der intravenösen Applikation dieser Liposome die Röntgenkontraste weitgehend verschwunden. Die schattengebenden Komponenten sind demnach bereits ausgeschieden worden. Entsprechend ihrer bekannten hohen Verträglichkeit und hohen Ausscheidungsgeschwindigkeit werden sie laufend entfernt. Bereits nach 24-48 Stunden sind die Kontrastmittel praktisch vollkommen aus dem Organismus ausgeschieden.

Damit ist das gesteckte Ziel erreicht worden, Kontrastmittel für die spezifische Darstellung der Leberorgane zu schaffen, die eine zuverlässige Diagnose ermöglichen und rasch wieder aus dem Organismus eliminiert werden und da-

her keine Langzeitschädigungen verursachen können, wie sie allen bisher geprüften Leberkontrastmitteln eigen sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft demnach Röntgenkontrastmittel, wie sie im Patentanspruch 1 definiert werden.

Besonders geeignete schattengebende Verbindungen sind 3,5-Bis-(acetylamino)-2,4,6-trijod-benzoesäure, 5-Acetamido-2,4,6-trijod-N-methylisophthalamidsäure, Adipinsäure-bis-(3-carboxy-2,4,6-trijod-anilid), Diglykolsäure-bis-(3-carboxy-2,4,6-trijod-anilid) oder 5,5'-(Adipoyldiamino)-bis-(2,4,6-trijod-N-methylisophthalamidsäure) bzw. deren Salze.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von Röntgenkontrastmitteln gemäss vorliegender Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass man ein Phospholipid in einer konzentrierten Salzlösung der schattengebenden Komponente der Formel I, gemäss Anspruch 1 dispergiert und daraus Liposome mit Multilayer-Struktur formt.

Beispiele

Kontrastmittelsubstanzen (= schattengebende Komponenten)

Amidotrizoat:

3,5-Bis-(acetylamino)-2,4,6-trijod-benzoesäure.

Acidum Ioxotrizoicum:

3-Acetamido-5-glycolamido-2,4,6-trijod-benzoesäure.

Metrizoat:

3-Acetamido-2,4,6-trijod-5-(N-methylacetamido-benzoesäure).

Acidum Iotalamicum:

5-Acetamido-2,4,6-trijod-N-methyl-isophthalamidsäure.

Acidum Ioxitalamicum:

5-Acetamido-N-(2-hydroxyethyl)-2,4,6-trijod-isophthalamidsäure.

Verwendet wird eine hochkonzentrierte Lösung des Natrium- oder N-Methylglukamin = (MGA)-Salzes oder eine Mischung beider Salze.

Adipodon:

Adipinsäure-bis-(3-carboxy-2,4,6-trijod-anilid) (50%ige Lösung des Natrium- oder MGA-Salzes).

Acidum Ioglycamicum:

Diglykolsäure-bis-(3-carboxy-2,4,6-trijodanilid) (50%ige Lösung des Natrium- und/oder MGA-Salzes).

Acidum Iocarmicum:

5,5'-(Adipoyldiamino)-bis-(2,4,6-trijod-N-methyl-isophthalamidsäure).

Lösung des Natrium- oder MGA-Salzes.

Trägermaterial

Phospholipide, insbesondere Lecithine variierender Zusammensetzung.

Herstellung der Liposome

Die Phospholipide werden in einem geeigneten organischen Lösungsmittel wie Methanol, Äthanol, Chloroform oder Methylenchlorid gelöst. Die Lösung wird in einem grossräumigen Kolben eingedampft, derart, dass die Kolbeninnenfläche von einem möglichst dünnen gleichmässigen Film überzogen ist. Das organische Lösungsmittel wird durch Anwendung von Fein- und/oder Hochvakuum vollständig entfernt.

Nun fügt man die konzentrierte wässrige Lösung der ge-

wünschten schattengebenden Komponente zu und schüttelt oder turbiniert.

Die entstandene Dispersion wird zentrifugiert (15' bei 25 000 g). Die Liposomensicht schwimmt oben auf. Sie wird von der überschüssigen Lösung des Kontrastmittels abgetrennt und in physiologischer Kochsalzlösung erneut dispergiert. Durch Zentrifugieren (2' bei 2000 g) trennt man die grösseren Teile ab. Die homogene, milchige kolloid-disperse Liposomen-Lösung stellt das gebrauchsfertige Röntgenkontrastmittel dar.

Alle Operationen werden unter Schutzgas, gewöhnlich Stickstoff, vorgenommen, um eine Oxydation der empfindlichen Phospholipide auszuschliessen. Alle verwendeten Ausgangsstoffe und Gefässe müssen sterilisiert oder sterilfiltriert werden. Alle Operationen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Herstellvorschrift

4 g einer aus Soja gewonnenen Mischung von Phospholipiden mit überschüssiger negativer Ladung werden unter Stickstoff in 40 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wird in einem 1-Liter-Kolben im Vakuum am Rotationsverdampfer langsam eingengt. An der Kolbenwand bildet sich ein gleichmässiger dünner Film. Dieser wird zunächst im Wasserstrahlvakuum und später im Hochvakuum bei maximal 50 °C getrocknet. Nach dem Trocknen werden 20–40 ml der einzuschliessenden konzentrierten wässrigen Lösung der schattengebenden Komponenten zugegeben. Durch Schütteln von Hand, durch Turbinieren oder mittels Vibromischer werden die Liposome gebildet. Leichtes Erwärmen fördert die Liposomenbildung. Sobald der ursprüngliche Film vollständig dispergiert ist, wird die entstandene milchige Lösung zentrifugiert (15' bei 25 000 g). Die gebildeten Liposome schwimmen auf der überschüssigen Lösung.

Die Lösung wird abdekantiert und durch dasselbe Volumen physiologischer Kochsalzlösung ersetzt. Die Liposome werden durch Schütteln oder mittels eines Vibromischers erneut dispergiert. Größere Partikel werden durch nochmaliges kurzes Zentrifugieren (2' bei 2000 g) abgetrennt. Die überstehende Emulsion stellt das gebrauchsfertige Röntgenkontrastmittel dar.

Pharmakologische Prüfungen

Die auf die oben beschriebene Weise erhaltenen Liposomen-Dispersionen wurden Kaninchen und Hunden intravenös appliziert, und zwar in Dosen von ca. 1–3 ml pro kg mit einer Injektionsgeschwindigkeit von ca. 0,2–10 ml/min. Die verwendeten Dispersionen enthielten etwa 0,05–0,2 schattengebende Komponente pro ml entsprechend ca. 30–120 mg Jod pro ml und weisen einen niedrigen osmotischen Druck auf.

Ergebnisse

Bereits 15 Minuten nach der intravenösen Verabreichung der Liposome war im Röntgenbild die Leber und gewöhnlich auch die Milz der Versuchstiere sichtbar.

Eine diagnostisch aussagekräftige Auswertung der Kontraste kann insbesondere durch Ausmessung mit Hilfe der Tomographie erfolgen. Dadurch werden selbst geringe visuell kaum registrierbare Kontrastdifferenzen quantitativ erfassbar.