

(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
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/064116 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 9/127**

[DE/DE]; Heinrich-Deppe-Ring 22, 37120 Boven-
den-Eddigehausen (DE). **LINDNER, Lars** [DE/DE];
Pelargonienweg 72, 81377 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01653

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Februar 2002 (15.02.2002)

(74) Anwälte: **WEICKMANN & WEICKMANN** usw.; Post-
fach 860 820, 81635 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
101 07 165.5 15. Februar 2001 (15.02.2001) DE

Veröffentlicht:

(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).

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **EIBL, Hansjörg**

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.

(54) Title: THERMOLABILE LIPOSOME WITH CONTROLLED RELEASE TEMPERATURE

(54) Bezeichnung: THERMOLABILES LIPOSOM MIT GEREGLTER FREIGABETEMPERATUR

(57) Abstract: The invention relates to a thermolabile liposome with controlled release temperature for the liposome content, which is essentially formed by at least one phosphatidyl choline with a main transition temperature ranging from 0 to 80 °C and 2 to 15 percent by weight of phosphatidyl oligoglycerin.

(57) Zusammenfassung: Ein thermolabiles Liposom mit geregelter Freigabetemperatur für den Liposominhalt ist im Wesentlichen aus mindestens einem Phosphatidylcholin mit einer Hauptumwandlungstemperatur, die im Bereich von 0 bis 80 °C liegt und 2 bis 15 Gew.-% Phosphatidyloligoglycerin gebildet.



WO 02/064116 A2

Thermolabiles Liposom mit geregelter Freigabetemperatur

Beschreibung

5

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.

10

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 Amphotericin 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, einer großen Anzahl von Fenestrierungen sowie diskontinuierlicher Basalmembranen (Murray and Carmichael 1995) besonders durchlässig sind, würde sich die Aufnahmewahrscheinlichkeit von Liposomen dadurch massiv erhöhen.

30

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

- 2 -

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 werden und damit die Zirkulationszeit verbessert werden kann. Neben einer Verbesserung der Zirkulationszeit besteht jedoch
5 großes Interesse an einer Möglichkeit, durch Temperatureinwirkung eine gezielte Freigabe der Liposominhaltsstoffe bei bestimmter Temperatur zu erreichen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Liposom zu schaffen, 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
15 wird.

Gelöst wird diese Aufgabe gemäß der Erfindung durch ein Liposom mit geregelter Freigabetemperatur für den Liposominhalt, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es im Wesentlichen aus mindestens einem
20 Phosphatidylcholin mit einer Hauptumwandlungstemperatur, die im Bereich von 0 bis 80 °C liegt und 2 bis 15 Gew.-% Phosphatidyloligoglycerin gebildet ist.

Erfindungsgemäß aufgebaute Liposomen weisen wesentlich verbesserte Halbwertszeiten von bis zu 20 Stunden im Serum auf und können durch
25 geeignete Wahl der Komponenten und Mengen der Komponenten in Abhängigkeit von deren Hauptumwandlungstemperatur den oder die Inhaltsstoffe bei einer vorbestimmten vorgewählten Temperatur rasch und vollständig freigeben.

30 Bevorzugt ist das erfindungsgemäße Liposom aus 65 bis 75 % Dipalmitoyllecithin (1,2-Dipalmitoylglycero-3-phosphocholin), 10 bis 30 %

- 3 -

Distearoyllecithin (1,2-Distearoylglycerol-3-phosphocholin) und 5 bis 10 % Dipalmitoylphosphoglyceroglycerin zusammengesetzt. Diese bevorzugte Zusammensetzung ist bei 37 °C im Serum stabil, gibt jedoch den Inhalt bei Überschreiten einer Temperatur von 40 °C rasch frei.

5

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 Hauptumwandlungstemperatur im Bereich von 0 bis 80 °C liegt. Die Hauptumwandlungstemperaturen sind wie aus der Tabelle erkennbar, abhängig von der Kettenlänge und der Verteilung über die Positionen 1 und 2 von Glycerol-3-phosphocholin oder 1 und 3 von Glycerol-2-phosphocholin.

10
15

Tabelle 1

	T_M	Phosphatidylcholin
5	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-
10	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-
15	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-
20	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-
25	80 °C	1,2-Dilignoceroyl-

Die in 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.

- 5 -

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)
5 verwendet.

Die erfindungsgemäßen thermolabilen Liposomen eignen sich hervorragend für die Anwendung auf verschiedenen Gebieten, insbesondere aber im Rahmen der regionalen Tiefenhyperthermie. Die regionale
10 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
15 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
20 (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
25 bedingt. Wird die Phasenumwandlungstemperatur durchlaufen, so kommt es einer kurzzeitigen Membraninstabilität und anschließende Freisetzung des liposomalen Inhalts.

Bei der oben erwähnten regionalen Hyperthermie wird der Tumor regional
30 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, Carboxyfluorescein o.dgl. allein oder zusammen mit einem Wirkstoff zur Freisetzung gebracht werden. Durch Verwendung von Kontrastmitteln wie Gadolinium wird eine nicht invasive Thermometrie
5 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.

10 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.

15 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.

20 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
25 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
30 üblicher Weise durch Auflösen der Lipide, z.B. in Chloroform oder Chloroform/Wasser/Isopropanol, Abziehendes Lösungsmittels, zweckmäßig im Vakuum im Rotationsverdampfer, Tempern der Lipide mit wässrigen

- 7 -

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
5 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
10 beispielsweise Polycarbonatmembranen definierter Porengröße, wie 100 bis 200 nm. Schließlich kann gegebenenfalls nicht eingekapselter Inhaltsstoff abgetrennt werden, beispielsweise durch Säulenchromatographie o.dgl.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

15

Beispiel 1

a) In der oben beschriebenen Weise werden Liposomen hergestellt, die aus 70 % DPPC, 20 % DSPC und 10 % DPPG2 zusammengesetzt sind. Sie enthalten eingekapseltes Carboxyfluorescein. Freies Carboxyfluorescein
20 wurde vorher durch Säulenchromatographie mit Sephadex G75 abgetrennt.

b) Chamber Modell:

Zur intravitalmikroskopischen Detektion der CF-Freisetzung aus thermolabilen Liposomen im Hyperthermiefeld eignet sich das
25 Chambermodell (A-Mel-3-Melanom des syrischen Hamsters) des syrischen Hamsters. Hierbei werden 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
30 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
5 gemessen werden (Endrich 1988).

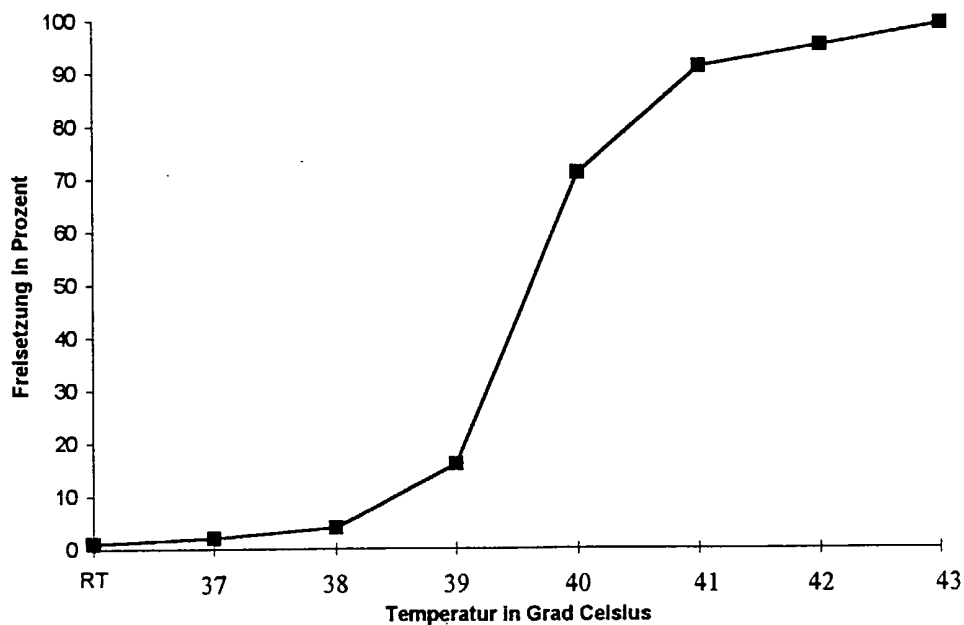
Neben der Vitalmikroskopie ist auch das Verfahren der MRT-Messung am Chamber-Modell etabliert (Pahernik et al. 1999). Hierbei können analog zur Mikroskopie MRT-Bilder aufgenommen werden.

10

Die erhaltenen Werte in vitro zeigt Tabelle 2.

A) in-vitro

Freisetzung von CF nach 5 Minuten Inkubation



Liposomenzusammensetzung:

DPPG:DSPC:DPPG-G2 = 7:2:1

Große Stabilität in Gegenwart von Serum bei 37°C (CF-Freisetzung nach 12 Stunden < 7%)

Ansprüche

1. Thermolabiles Liposom mit geregelter Freigabetemperatur für den
5 Liposominhalt,
dadurch gekennzeichnet,
dass es im Wesentlichen aus mindestens einem Phosphatidylcholin
mit einer Hauptumwandlungstemperatur, die im Bereich von 0 bis 80
°C liegt und 2 bis 15 Gew.-% Phosphatidyloligoglycerin gebildet ist.
- 10 2. Liposom nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass es mindestens ein Phosphatidylcholin, ausgewählt aus der
Gruppe, bestehend aus 1-Palmitoyl-2-olioylglycero-3-phosphocholin,
15 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-
20 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-
25 phosphocholin, 1,3-Distearoylglycero-2-phosphocholin, 1,2-
Distearoylglycero-3-phosphocholin, 1,2-Diarachinoylglycero-3-
phosphocholin, 1,2-Dibehenoylglycero-3-phosphocholin und 1,2-
Dilignoceroylglycero-3-phosphocholin, enthält.
- 30 3. Liposom nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,

- 10 -

dass es als Phosphatidyloligoglycerin
Dipalmitoylphosphoglyceroglycerin enthält.

4. Liposom nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet,
dass es im Wesentlichen aus 65 bis 75 % Dipalmitoyllecithin
(DPPC), 15 bis 25 % Distearoyllecithin (DSPC) und 5 bis 10 %
Dipalmitoylphosphoglyceroglycerin (DPPG2) besteht.
- 10 5. Liposom nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass es kein Cholesterin enthält.
6. Liposom nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
15 dadurch gekennzeichnet,
dass es einen Wirkstoff oder/und eine Markierungssubstanz enthält.