



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 32 184 T2** 2009.01.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 272 161 B1**  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 32 184.7**  
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK01/00268**  
(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 921 262.0**  
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/076556**  
(86) PCT-Anmeldetag: **11.04.2001**  
(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **18.10.2001**  
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.01.2003**  
(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **02.01.2008**  
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.01.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 9/127** (2006.01)  
**A61P 33/00** (2006.01)  
**A61K 9/107** (2006.01)  
**A61K 31/685** (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**200000616**      **12.04.2000**      **DK**

(73) Patentinhaber:  
**Liplasome Pharma A/S, Lyngby, DK**

(74) Vertreter:  
**Anwaltskanzlei Gulde Hengelhaupt Ziebig &  
Schneider, 10179 Berlin**

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

(72) Erfinder:  
**JORGENSEN, Kent, DK-2880 Bagsvaerd, DK;  
DAVIDSEN, Jesper, DK-2100 Copenhagen, DK;  
VERMEHREN, Charlotte, DK-4100 Sotofte, DK;  
FROKJAER, Sven, DK-2840 Holte, DK;  
MOURITSEN, Ole G., DK-5230 Odense, DK**

(54) Bezeichnung: **AUF LIPIDEN BASIERENDE ARZNEISTOFFABGABESYSTEME GEGEN PARASITÄRE INFEKTIO-  
NEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die Erfindung betrifft auf Lipiden basierende pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verwendung bei der Behandlung oder beim Nachweis parasitärer Infektionen.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Die US 5,827,836 offenbart mit Retinoyl substituierte Glycerophosphoethanolamine. Es wird konstatiert, dass die Verbindungen und Salze davon eine Tumoren, Psoriasis und Entzündungen hemmende Aktivität aufweisen. Eine mögliche Klasse von Verbindungen weist einen Fettether-Substituenten an der Position 1, einen Retinoidester-(Retinoyl-)Substituenten an der Position 2 und einen Phosphoethanolamin-Substituenten an der Position 3 auf. Es wird erwähnt, dass einige der Verbindungen in einer Liposomenformulierung präsentiert werden können.

**[0003]** Die US 4,372,949 offenbart ein karzinostatisches und die Immunabwehr stimulierendes Mittel, das ein Lysophospholipid und ein Phospholipid enthält. Beispiele für Verbindungen sind 3-Phosphorylcholin mit einem C<sub>5-22</sub>-Acyloxy- oder C<sub>5-22</sub>-Alkoxy-Substituenten an der Position 1 und einem Wasserstoff-, Hydroxy-, C<sub>1-5</sub>-Acyloxy- oder C<sub>1-5</sub>-Alkoxy-Substituenten an der Position 2. Es wird erwähnt, dass die Mittel in Form von Mizellen oder Lipidvesikeln dispergiert sein können.

**[0004]** Die US 5,484,911 offenbart Nukleosid-5'-diphosphat-Konjugate von Etherlipiden, die eine antivirale Aktivität aufweisen. Die Verbindungen können einen Fettether-/Thioether-Substituenten an der Position sn-1 und einen Fettsäureester-Substituenten an der Position sn-2 aufweisen. Die Verbindungen sind so konzipiert, dass sie die Zellmembran durchdringen, woraufhin das Nukleosid-Arzneimittel durch Spaltung durch intrazelluläre Phosphatasen freigesetzt wird. Es wird ferner vorgeschlagen, dass die ebenfalls freigesetzten Etherlipide nachfolgend durch intrazelluläre Phospholipase A<sub>2</sub> gespalten werden können. Es wird vorgeschlagen, dass die Konjugate in Form von Mizellen präsentiert werden können, die von Makrophagen leichter aufgenommen werden können.

**[0005]** Die US 4,622,392 offenbart zytotoxische Verbindungen in der Art von Nukleotid-Lipid-Konjugaten.

**[0006]** Die ES 2 034 884 offenbart 2-aza-Phospholipide als PLA<sub>2</sub>-Hemmer. In ähnlicher Weise offenbaren de Haas et al. (Biochem. Biophys. Acta, Lipid and Lipids Metabolism, 1167 (1993) Nr. 3, S. 281–288) die Hemmung von PLA<sub>2</sub> der Bauchspeicheldrüse durch (R)-2-Acylamino-Phospholipid-Analoga.

**[0007]** Hoffman et al., Blood, Bd. 63, Nr. 3 (März), 1984, S. 545–552, offenbaren die Zytotoxizität von PAF und verwandten Alkylphospholipid-Analoga in menschlichen Leukämiezellen.

**[0008]** Die WO 94/09014 offenbart Phosphorsäureester als PLA<sub>2</sub>-Hemmer. Eine Gruppe der Hemmer sind 1-O-Phospho-2-O-(C<sub>2-21</sub>-acyl)-(C<sub>12-24</sub>-alkane).

**[0009]** Xia und Hui offenbaren die chemische Synthese einer Reihe von Etherphospholipiden aus D-Mannitol und ihre Eigenschaften als tumorzytotoxische Mittel.

**[0010]** Die US 5,985,854, US 6,077,837, US 6,136,796 und US 6,166,089 beschreiben Prodrugs mit gesteigertem Eindringen in Zellen, die besonders nützlich zur Behandlung eines Zustands oder einer Erkrankung beim Menschen sind, der/die mit einer supranormalen Aktivität intrazellulärer Enzyme verbunden ist. Die Prodrugs können sn-2-Ester von Lysophospholipiden sein. Solche Arzneimittel sind so konzipiert, dass sie von intrazellulärer Phospholipase A<sub>2</sub> gespalten werden.

**[0011]** Vadas et al. (Infection and Immunity, 60 (1992) 3928–3931 und Am. J. Trop. Hyg. 49 (1993) 455–459) beschreiben die Auslösung der Expression zirkulierender PLA<sub>2</sub> beim Menschen bei durch Plasmodium falciparum ausgelösten Malariainfektionen.

**[0012]** Lux et al. (Biochem. Parasitology 111 (2000) 1–14) beschreiben die Leishmania hemmende Wirkung bestimmter Etherlipid-Analoga, von der angenommen wird, dass sie durch die Interferenz mit wichtigen Biosynthesen des Parasiten verursacht wird.

[0013] Hart et al. (Drugs of today 34 (1998) 117–131) beschreiben, wie die antimetabolische Wirkung von Etherlipid-Analoga eine Störung der Biosynthese zentraler Membran-Glycolipide und -Glycoproteine von Leishmania zur Folge haben kann.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0014] Die Erfindung wird durch die Ansprüche beschrieben.

[0015] Arzneimittelabgabesysteme sind besonders nützlich bei der Behandlung parasitärer Infektionen, insbesondere parasitärer Infektionen, bei denen der Lebenszyklus des Parasiten die Leber und/oder die Milz des infizierten Organismus betrifft. Liposomen werden nur in sehr geringem Maße von in der Blutbahn vorhandenen Enzymen abgebaut, wohingegen die Liposomen in der Leber und/oder Milz durch die in diesen Organen vorhandenen Makrophagen aufkonzentriert und abgebaut werden. Dieser Abbau der Liposomen setzt Bestandteile frei, die so konzipiert sind, dass sie für verschiedene Arten von Parasiten toxisch sind. Demgemäß kann im Fall einer parasitären Infektion von durch das Vorhandensein von Makrophagen gekennzeichneten Geweben, wie z. B. der Leber und/oder der Milz, eine hoch effiziente und indirekt spezifische Freisetzung von für Parasiten toxischen Stoffen erreicht werden.

[0016] Noch eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die diagnostische Verwendung der derzeit beschriebenen Arzneimittelabgabesysteme, wobei das Arzneimittelabgabesystem eine Markierung trägt, die durch die vorstehend beschriebene Wirkung, spezifisch zu dem Gewebe oder den Organen hin geleitet wird, das/die durch den Parasiten infiziert sind.

#### BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0017] **Fig. 1.** Wärmekapazitätskurven, erhalten mittels Differenzialscanningkalorimetrie. (a) Multilamellare, MLV-, (obere Kurve) und unilamellare, LUV-, (untere Kurve) Liposomen, hergestellt aus 1 mM 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (1-O-DPPC). (b) MLV- (obere Kurve) und LUV- (untere Kurve) Liposomen, hergestellt aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC).

[0018] **Fig. 2.** Charakteristisches Reaktionszeitprofil bei 41°C für die Hydrolyse unilamellarer Liposomen, zusammengesetzt aus 1-O-DPPC, durch Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>, (*A. piscivorus piscivorus*). Die PLA<sub>2</sub>-Hydrolyseereaktion wird anhand der Eigenfluoreszenz (durchgehende Linie) vom Enzym und der statischen Lichtstreuung bei 90° (gestrichelte Linie) von der Lipid-Suspension überwacht. Nach der Zugabe von PLA<sub>2</sub> bei 800 sek zur ins Gleichgewicht gebrachten Liposomen-Suspension folgt eine charakteristische Verzögerungszeit, bevor die katalytische Aktivität plötzlich zunimmt. Proben für HPLC wurden vor der Zugabe des Enzyms und 20 Minuten nach der beobachteten Verzögerungszeit genommen.

[0019] **Fig. 3.** HPLC-Chromatogramme, welche die Wirkung der Hydrolyse von aus 1-O-DPPC zusammengesetzten Liposomen durch Phospholipase A<sub>2</sub> illustrieren. Die Chromatogramme zeigen die Menge an 1-O-DPPC (100%, durchgehende Linie) vor der Zugabe von Phospholipase A<sub>2</sub> (*A. piscivorus piscivorus*) zu der Liposomen-Suspension und die Menge an 1-O-DPPC (21%, gestrichelte Linie) nach dem verzögerten Ausbruch.

[0020] **Fig. 4.** Durch PLA<sub>2</sub> gesteuerte Freisetzung des fluoreszierenden Modellarzneimittels Calcein aus Liposomen, zusammengesetzt aus 25 µM 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (1-O-DPPC), suspendiert in einem 10 mM HEPES-Puffer (pH = 7,5), bezogen auf die Zeit. 25 nM Phospholipase A<sub>2</sub> (*A. piscivorus piscivorus*) wurden zur Zeit von 900 sek zugegeben; die Temperatur betrug 37°C. Der Prozentsatz an freigesetztem Calcein wird bestimmt als:

% Freisetzung =  $100 \times (I_{F(t)} - I_B) / (I_T - I_B)$ , wobei  $I_{F(t)}$  die gemessene Fluoreszenz zur Zeit  $t$  nach der Zugabe des Enzyms ist,  $I_B$  die Hintergrundfluoreszenz ist und  $I_T$  die Gesamtfluoreszenz ist, gemessen nach der Zugabe von Triton X-100, die zur kompletten Freisetzung von Calcein durch Aufbrechen der Liposomen führt.

[0021] **Fig. 5.** Durch PLA<sub>2</sub> gesteuerte Freisetzung des fluoreszierenden Modellarzneimittels Calcein durch die Zielmembran nicht hydrolysierbarer Membranen hindurch (siehe **Fig. 11b**) bezogen auf die Zeit für Liposomen, zusammengesetzt aus 25 µM 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (1-O-DPPC), suspendiert in einem 10 mM HEPES-Puffer (pH = 7,5). 25 nM Phospholipase A<sub>2</sub> wurden zur Zeit von 0 sek zugegeben, und die Temperatur betrug 37°C. Der Prozentsatz an freigesetztem Calcein wird bestimmt wie in **Fig. 4** beschrieben.

**[0022] Fig. 6.** Hämolyse-Profil normaler roter Blutzellen in Gegenwart von Liposomen, zusammengesetzt aus 100% 1-O-DPPC (Quadrat), 95% 1-O-DPPC und 5% negativ geladenem 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-350] (1-O-DPPE-PEG350) (Dreiecke) und 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholin (ET-18-OCH<sub>3</sub>) (Rhomben). Die 5% Hämolyse (H<sub>5</sub>) ergebenden Konzentrationen lagen für aus 100% 1-O-DPPC zusammengesetzte Liposomen und für aus 90% 1-O-DPPC mit 5% DPPE-PEG350 zusammengesetzte Liposomen deutlich über 2 mM. Der Hämolyse-Versuch wurde durchgeführt, wie von Perkins et al., 1997, Biochimica et Biophysica Acta 1327, 61–68 beschrieben. Kurz gefasst, wurde jede Probe nacheinander mit mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) verdünnt, und 0,5 ml jeder verdünnten Suspension wurden mit 0,5 ml gewaschenen menschlichen roten Blutzellen (RBC) [4% in PBS (v/v)] gemischt. Probe und Standard wurden bei 37°C in einem Inkubator platziert und 20 Stunden bewegt. Die Röhrchen wurden mit niedriger Geschwindigkeit (2000 × G) 10 Minuten zentrifugiert, und 200 µl of des Überstands wurden durch Absorbanz bei 550 nm quantitativ bestimmt. 100 Prozent Hämolyse wurden als maximale Hämolyse, erhalten durch das Detergens Triton X-100, definiert. Das Hämolyse-Profil in [Fig. 6](#) zeigt einen niedrigen Hämolyse-Wert (unter 5%) für 2 mM 1-O-DPPC-Liposomen und für 1-O-DPPC-Liposomen mit 5% 1-O-DPPE-PEG350.

**[0023] Fig. 7.** Charakteristische Reaktionszeitprofile bei 41°C für die Hydrolyse unilamellarer Liposomen, inkorporiert mit 0 und 5% 1-O-DPPE-PEG350, durch PLA<sub>2</sub> (*A. piscivorus piscivorus*). Die PLA<sub>2</sub>-Hydrolysereaktion wird anhand der Eigenfluoreszenz (durchgehende Linie) vom Enzym und der statischen Lichtstreuung bei 90° (gestrichelte Linien) von der Suspension überwacht. Nach der Zugabe von PLA<sub>2</sub> zur ins Gleichgewicht gebrachten Liposomen-Suspension folgt eine charakteristische Verzögerungszeit, bevor die katalytische Aktivität plötzlich zunimmt.

**[0024] Fig. 8.** Durch PLA<sub>2</sub> gesteuerte Freisetzung des fluoreszierenden Modellarzneimittels Calcein durch die Zielmembran nicht hydrolysierbarer D-O-SPC-Membranen bezogen auf die Zeit für Mizellen, zusammengesetzt aus 25 µM 1-O-DPPE-PEG350 (gepunktete Linie), DSPE-PEG750 (gestrichelte Linie), suspendiert in einem 10 mM HEPES-Puffer (pH = 7,5). Die Phospholipase A<sub>2</sub> (25 nM) wurde zur Zeit von 1200 sek zugegeben, und die Temperatur betrug 41°C. Der Prozentsatz an freigesetztem Calcein wird bestimmt, wie in [Fig. 4](#) beschrieben. Die durch PLA<sub>2</sub> katalysierte Hydrolyse von 1-O-DPPE-PEG350 löste die schnellste und höchste Freisetzung aus.

**[0025] Fig. 9.** HPLC-Chromatogramme, welche die Wirkung der Hydrolyse von aus DSPE-PEG750 (0,150 mM) zusammengesetzten Liposomen durch Phospholipase A<sub>2</sub> illustrieren. Die Chromatogramme zeigen die Menge an Stearinsäure, die erzeugt wurde, bevor (durchgehende Linie) Phospholipase A<sub>2</sub> (*A. piscivorus piscivorus*) zu der Mizellen-Suspension gegeben wurde, und die Menge (gestrichelte Linie) an DSPE-PEG750 nach dem verzögertem Ausbruch. Die gepunktete Linie zeigt reine Stearinsäure (0,4 mM). Die prozentuale Hydrolyse wurde auf der Grundlage des integrierten Bereichs des Stearinsäure-Standards (115850 Einheiten) und des integrierten Bereichs der Probe (45630 Einheiten) berechnet. Die Konzentration der Stearinsäure in der Probe wurde mit  $(45630/115850 \times 0,4 \text{ mM})$  0,157 mM berechnet, d. h. 100% des DSPE-PEG750 wurden zu Lyso-SPE-PEG750 und Stearinsäure hydrolysiert.

**[0026] Fig. 10.** Beschreibt das Prinzip der Anvisierung, Freisetzung und Absorption liposomaler Arzneimittel durch extrazelluläre Enzyme.

- (I) Reticuloendotheliales System, z. B. Makrophagen in Leber und Milz, infiziert mit Parasiten (d. h. Leishmania)
- (II) Prodrug-Trägerliposom
- (III) Parasitäre Zielzelle und deren Zellmembran
- (IV) Prodrug (d. h. Monoetherlipid), Pro-Verstärker (Lipid), Pro-Aktivator (Lipid)
- (V) Arzneimittel (d. h. Etherlysolipid und Fettsäurederivate), Verstärker (Lysolipid + Fettsäure), PLA<sub>2</sub>-Aktivatoren (Lysolipid + Fettsäure)

**[0027] Fig. 11.** Schematische Illustration eines Prinzips der Anvisierung liposomaler Arzneimittel, das eine Akkumulation der liposomalen Arzneimittel-Träger durch das RES in porösem erkranktem Gewebe und die nachfolgende Freisetzung des Arzneimittels und den Transport durch die Zielmembran über die Aktivität extrazellulärer PLA<sub>2</sub> einschließt.

- (I) Prodrug-Trägerliposom
- (II) Nicht abbaubare Liposomen-Zielmembran
- (III) Nicht hydrolysierbare Etherlipide
- (IV) Pro-Verstärker (Lipid), Prodrug (d. h. Monoetherlipid), Pro-Aktivator (Lipid)
- (V) Verstärker (Lysolipid + Fettsäure), Arzneimittel (d. h. Etherlysolipid und Fettsäurederivate), PLA<sub>2</sub>-Akti-

vatoren (Lysolipid + Fettsäure)

**[0028] Fig. 12.** (a) Durch PLA<sub>2</sub> gesteuerte Freisetzung des fluoreszierenden Modellarzneimittels Calcein durch die Zielmembran bezogen auf die Zeit für verschiedene Zusammensetzungen der Trägerliposomen. Die Temperatur beträgt 37°C. Im Vergleich zu reinen DPPC-Trägern ist die Freisetzungsgeschwindigkeit des Modellarzneimittels bei den mit 2,5 Mol-% des negativ geladenen DPPE-PEG2000 drastisch erhöht. Eine weitere Steigerung der Freisetzungsgeschwindigkeit wird erhalten, wenn der Träger auch ein kurzkettiges Phospholipid, Didecanoylphosphatidylcholin (DCPC), enthält, das als lokaler Aktivator für das Enzym wirkt. Der Prozentsatz an freigesetztem Calcein wird bestimmt als: % Freisetzung =  $100 \times (I_{F(t)} - I_B) / (I_T - I_B)$ , wobei  $I_{F(t)}$  die gemessene Fluoreszenz zur Zeit  $t$  nach der Zugabe des Enzyms ist,  $I_B$  die Hintergrundfluoreszenz ist und  $I_T$  die Gesamtfluoreszenz ist, gemessen nach der Zugabe von Triton X-100, die zur kompletten Freisetzung von Calcein durch Aufbrechen der Zielliposomen führt. (b) Durch PLA<sub>2</sub> gesteuerte Freisetzung des fluoreszierenden Modellarzneimittels Calcein durch die Zielmembran hindurch bezogen auf die Zeit für verschiedene Temperaturen. Wenn die Temperatur erhöht wird, wird die Freisetzungsgeschwindigkeit gesteigert, aufgrund einer erhöhten Aktivität des Enzyms, ausgelöst durch Strukturänderungen im Lipid-Doppelschicht-Substrat des Trägerliposoms. Im vorliegenden Versuch wird in allen Fällen eine maximale Freisetzung von ca. 70% erreicht. Die Einfügung zeigt die Zeit von 50% Calceinfreisetzung,  $t_{50\%}$ , bezogen auf die Temperatur. Die Konzentration der Ziel- und Trägerliposomen beträgt 25 µM, und PLA<sub>2</sub> wird in einer 25 nM Konzentration in einem HEPES-Puffer mit pH = 7,5 zugegeben.

**[0029] Fig. 13.** Gesamtfreisetzung nach 20 min des fluoreszierenden Modellarzneimittels Calcein durch die Zielmembran hindurch bezogen auf die Zugabe zunehmender Mengen an Lysopalmitoylphospholipid und Palmitinsäure, separat und in einem 1:1-Gemisch. Die Konzentration der Zielmembranen beträgt 25 µM in einem HEPES-Puffer mit pH = 7,5 bei einer Temperatur von 39°C.

**[0030] Fig. 14.** Durch PLA<sub>2</sub> gesteuerte Freisetzung des fluoreszierenden Modellarzneimittels Calcein aus Liposomen, zusammengesetzt aus 25 µM 90 Mol-% 1-O-DPPC und 10 Mol-% des negativ geladenen 1-O-DPPE-PEG350, suspendiert in einem 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,5), bezogen auf die Zeit. 50 nM (gerade Linie), 1 nM (durchgehende Linie) und 0,02 nM (gepunktete Linie) Phospholipase A<sub>2</sub> (*A. piscivorus piscivorus*) wurden zur Zeit von 300 sek zugegeben; die Temperatur betrug 35,5°C. Der Prozentsatz an freigesetztem Calcein wird bestimmt, wie in [Fig. 4](#) beschrieben.

**[0031] Fig. 15.** Emissionsspektrum von 1 Mol-% bis-py-DPC, inkorporiert in negativ geladenen Liposomen (0,100 mM) vor (durchgehende Linie) und nach (gestrichelte Linie) der Zugabe von 100 nM PLA<sub>2</sub> (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) zu einer bei 41°C ins Gleichgewicht gebrachten Liposomen-Suspension.

**[0032] Fig. 16.** Charakteristisches Reaktionszeitprofil bei 41°C für die durch Phospholipase von Ratten katalysierte Hydrolyse negativ geladener Liposomen. Die katalytische Reaktion wurde ausgelöst durch die Zugabe von zellfreier Peritonealflüssigkeit zu 2,5 ml der thermostatierten Liposomen-Suspension, die vor der Zugabe der Peritonealflüssigkeit 60 sek ins Gleichgewicht gebracht wurde. Die Hydrolyse-Reaktion wird anhand der Monomer-Fluoreszenz (durchgehende Linie) und der Excimer-Fluoreszenz (gestrichelte Linie) von bis-py-DPC überwacht. Nach der Zugabe von unverdünnter Peritonealflüssigkeit bei 60 sek zu der ins Gleichgewicht gebrachten Liposomen-Suspension wird im Zuge der Hydrolyse des bis-py-DPC-Substrats eine plötzliche Zunahme der Monomer-Fluoreszenz und eine gleichzeitige Abnahme der Excimer-Fluoreszenz beobachtet. Die Einfügung zeigt das Reaktionszeitprofil der ersten 120 sek.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0033]** Die Erfindung wird durch die Ansprüche definiert.

**[0034]** Ein wichtiges Merkmal ist die Realisierung der raschen Aufnahme von Liposomen in vivo durch Zellen des mononuklearen Phagozytensystems (MPS). Das MPS umfasst die Makrophagen, eine der wichtigsten Komponenten des Immunsystems, insbesondere bei der Beseitigung von Fremdpartikeln einschließlich Liposomen. Die Makrophagen sind in verschiedenen Organen und Geweben ansässig, z. B. im Bindegewebe (als Histiozyten), in der Leber (Sternzellen) und als freie und fixe Makrophagen in der Milz, im Knochenmark und in den Lymphknoten.

**[0035]** Wenn Liposomen im Allgemeinen intravenös verabreicht werden, werden sie typischerweise durch die Makrophagen der Leber, der Milz und des Knochenmarks aus dem Kreislauf entfernt. Diese Entfernung besteht aus einer ersten Oponisierung durch Blutproteine, gefolgt von der Aufnahme dieser markierten Liposo-

men durch die Makrophagen. Die Immunopsonine umfassen Immunglobuline und Komplement-Proteine, und obwohl jedes Opsonin seine eigene Interaktion aufweist und verschiedene Schicksale bewirkt, scheint es, dass die Leber-Maskierung komplementvermittelt ist und die Milz die opsonierten Liposomen im Allgemeinen entfernt. Die durch die Opsonisierung erhaltene gesteigerte Beseitigung der erfindungsgemäßen Liposomen kann als passive Anvisierung gekennzeichnet werden.

**[0036]** Da die MPS-Aufnahme von Liposomen zur Akkumulation der Liposomen in Geweben wie der Leber, der Milz und dem Knochenmark führt, ermöglicht sie eine gegen parasitäre Infektionen dieser Gewebe gerichtete Anvisierung. Die Liposomen, die bei den Anwendungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen Bestandteile, die als eine Markierung zum Nachweisen von mit Parasiten infiziertem/n Gewebe/Organen wirken können oder als Antiparasitika wirken können, wenn sie aus den Liposomen in die Gewebe eines an einer parasitären Infektion leidenden Säugetiers freigesetzt werden.

**[0037]** Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung parasitärer Infektionen, die durch eine Erhöhung des PLA<sub>2</sub>-Spiegels in einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, gekennzeichnet sind, indem dem Säugetier eine wirksame Menge eines auf Lipiden basierenden Abgabesystems zur Verabreichung eines aus Lysolipid-Derivaten ausgewählten Arzneimittel-Wirkstoffs verabreicht wird, wobei der Arzneimittel-Wirkstoff in dem auf Lipiden basierenden System in Form eines Prodrug vorliegt, wobei das Prodrug ein Lipid-Derivat ist, das aufweist: (a) eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen und ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen und (b) einen hydrophilen Rest, wobei das Prodrug ferner ein Substrat für extrazelluläre Phospholipase A2 ist, in dem Maße, dass das organische Radikal hydrolytisch abgespalten werden kann, wohingegen die aliphatische Gruppe im Wesentlichen unangegriffen bleibt, wodurch der Arzneimittel-Wirkstoff in Form eines Lysolipid-Derivats freigesetzt wird, das kein Substrat für Lysophospholipase ist. Das Lipid-Derivat wird nachstehend und in den Ansprüchen näher beschrieben.

**[0038]** Eine weitere Ausführungsform betrifft ein Verfahren zur Behandlung parasitärer Infektionen, die durch eine Erhöhung des PLA<sub>2</sub>-Spiegels in einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, gekennzeichnet sind, indem dem Säugetier eine wirksame Menge des vorstehend beschriebenen auf Lipiden basierenden Abgabesystems zur Verabreichung eines zweiten Stoffs verabreicht wird, wobei der zweite Stoff ein in das System inkorporiertes Antiparasitikum ist.

**[0039]** Bei einer speziellen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der erhöhte PLA<sub>2</sub>-Spiegel auf ein bestimmtes Gewebe und/oder Organ des Säugetiers örtlich beschränkt, wobei das Gewebe und/oder Organ mit dem Parasiten infiziert ist. Die Anwendungen der vorliegenden Erfindung umfassen insbesondere eine Situation, bei der die parasitäre Infektion die Leber und/oder die Milz und/oder das Knochenmark des Säugetiers betrifft.

**[0040]** Die Behandlung erfolgt vorzugsweise durch die systemische Verabreichung des erfindungsgemäßen auf Lipiden basierenden Abgabesystems, noch bevorzugter die parenterale Verabreichung durch Injektion, wie z. B. intravenöse Injektion.

**[0041]** Noch eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose einer parasitären Infektion, die durch eine Erhöhung des PLA<sub>2</sub>-Spiegels des infizierten Gewebes gekennzeichnet ist, indem dem Säugetier eine wirksame Menge des vorstehend beschriebenen auf Lipiden basierenden Abgabesystems zur Verabreichung eines zweiten Stoffs verabreicht wird, wobei der zweite Stoff eine in das System inkorporierte Markierung ist. Indem einem Patienten mit Verdacht auf eine parasitäre Infektion ein solches Konstrukt verabreicht wird, kann bestimmt werden, ob der Patient infiziert ist, und im Fall einer parasitären Infektion werden die örtlich beschränkten Bereiche des Körpers des Patienten identifiziert, die den Parasiten beherbergen. Die örtlich beschränkte Zufuhr des Diagnostikums – der Markierung – ermöglicht die Verwendung bilderzeugender Diagnosewerkzeuge, wie z. B. Positronenemissionstomographie (PET), Röntgen, Gamma-Szintigraphie, Bilderzeugung mittels Magnetresonanz (MR), Bilderzeugung mittels Computertomographie (CT) und Ultraschall.

**[0042]** Die für die medizinische Bilderzeugung anwendbaren Markierungen werden ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus diagnostischen Radionukliden, wie z. B. <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc, <sup>67</sup>Ga, <sup>11</sup>C, paramagnetischen Ionen, wie z. B. Gd und Mn und Eisenoxid, Gas, wie z. B. Luft, Argon, Stickstoff, Iod, Brom und Barium.

## Parasitäre Zielorganismen

**[0043]** Die erfindungsgemäßen Liposomen können verschiedene Etherlipid-Analoga in Gewebe, die Parasiten beherbergen, abgeben, aufgrund der erhöhten PLA<sub>2</sub>-Spiegel des Gewebes. Die Etherlipid-Analoga führen nachgewiesenermaßen zu einer Störung von Schlüsselenzymen, die z. B. an der Alkylphospholipid-Biosynthese von Parasiten, wie z. B. *Leishmania* und *Trypanosomas*, beteiligt sind (Lux et al. *Biochem. Parasitology* 111 (2000) 1–14), und sind daher bei Verabreichung in ausreichender Menge für die Parasiten toxisch.

**[0044]** Da die Leber, die Milz und das Knochenmark Organe/Gewebe sind, in denen hohe Konzentrationen von Makrophagen zu finden sind, ist das Anvisieren von Parasiten, die diese Organe bewohnen, bevorzugt, wegen der resultierenden Akkumulation erfindungsgemäßer Liposomen, aber andere Gewebe, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie bei einer parasitären Infektion erhöhte PLA<sub>2</sub>-Spiegel aufweisen, können auch von Interesse sein.

**[0045]** Ferner sind auch parasitäre Infektionen, die durch stark erhöhte Spiegel der zirkulierenden PLA<sub>2</sub> gekennzeichnet sind, wie z. B. Malaria auslösende Parasiten, z. B. ausgelöst durch *Plasmodium falciparum*, Ziele für die Behandlung mit erfindungsgemäßen Liposomen. Dieses Merkmal erhöhter Spiegel zirkulierender PLA<sub>2</sub> von durch den Parasiten *Plasmodium falciparum* ausgelösten Malariainfektionen ist z. B. von Vadas et al. (*Infection and Immunity*, 60 (1992) 3928–3931 und *Am. J. Trop. Hyg.* 49 (1993) 455–459) beschrieben worden.

**[0046]** Beispiele für parasitäre Infektionen, die zur Erhöhung des PLA<sub>2</sub>-Spiegels des den Parasiten beherbergenden Gewebes führen, sind nachstehend angegeben.

## Leishmania

**[0047]** Angehörige des Genus *Leishmania* sind in der Lage, verschiedene Wirbeltierarten einschließlich Menschen, Hunde und Nagetiere zu infizieren, und die verschiedenen Arten von Leishmaniose sind vor allem, jedoch nicht ausschließlich, auf Mittel- und Südamerika, Zentralafrika und Teile von Süd- und Zentralasien begrenzt.

**[0048]** Der Lebenszyklus der Angehörigen des Genus schließt einen Wirbeltier-Wirt, z. B. den Menschen, und einen Überträger, der den Parasiten zwischen Wirbeltier-Wirten überträgt, ein. Im Fall von *Leishmania* sind verschiedene Arten der *Phlebotomus*-Sandfliegen der Überträger.

**[0049]** Die charakteristische morphologische Form, die der *Leishmania*-Parasit im Überträger annimmt, ist die des Promastigoten, und in diesem Zustand vermehrt er sich ungeschlechtlich im Darm des Überträgers. Beim Beißen des Wirbeltier-Wirts werden Promastigoten aus dem Überträger in den Wirbeltier-Wirt injiziert. Nach dem Eintritt in den Wirbeltier-Wirt gehen die Promastigoten in eine Form über, die als Amastigot bezeichnet wird. Der Amastigot vermehrt sich in den Zellen des Wirts, und wenn die Zelle des Wirbeltier-Wirts schließlich stirbt, werden die Amastigoten freigesetzt und infizieren potenziell weitere Zellen. Die mit Leishmaniose verbundene(n) Symptome und Pathologie resultieren daraus, dass die Amastigoten die Zellen des Wirts töten.

**[0050]** *Leishmania* ist der Auslöser mehrerer verschiedener Zustände, abhängig vom Ort der Infektion des Wirbeltier-Wirts. Bei einigen Erkrankungen breiten sich die Amastigoten nicht über die Bissstelle des Überträgers hinaus aus, was dann zu einer "kutanen Leishmaniose", auch bekannt als Orientbeule, Jerichobeule, Aleppobeule oder Dehlibeule, führt. Diese Zustände heilen häufig spontan. In anderen Fällen können sich die Amastigoten auf die viszerale Organe, d. h. die Leber und die Milz, ausbreiten, was zu "viszeraler Leishmaniose", auch bekannt als Kala-azar oder Dum-Dum-Fieber, führt. Ferner können sich die Amastigoten auf die Mund- und Nasenschleimhäute ausbreiten, was zum Zustand der "mucokutanen Leishmaniose", auch bekannt als Espundia oder Uta, führt. Unbehandelt führen diese letztgenannten Erkrankungen zu hohen Sterblichkeitsraten.

**[0051]** Nicht einschränkende Beispiele für *Leishmania*-Arten sind *Leishmania major* Friedlin, *Leishmania (viannia) gr.*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani* (infantum), *Leishmania aethiopia*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania enriettii*, *Leishmania chagasi* und *Leishmania pipanoi*.

**[0052]** Herkömmliche Wirkstoffe in der Leishmaniose-Therapie sind Verbindungen wie die fünfwertigen Antimon-Verbindungen Natriumstibogluconat (Pentosram™) und Megluminantimonat (Glucantime™); weitere Arzneimittel sind Amphotericin, Metronidazol, Allopurinol und Pentamidin, ferner Paromomycin und Interferon-Gamma.

**[0053]** Sowohl für die Behandlung von Malaria als auch die Behandlung von Leishmaniose ist ein neues Arzneimittel, Licochalcon A, vorgeschlagen worden, der ursprünglich aus den Wurzeln des chinesischen Süßholzes isoliert wurde.

#### Trypanosoma

**[0054]** Drei Hauptarten von Trypanosomen lösen beim Menschen Erkrankungen aus: *Trypanosoma gambiense* und *Trypanosoma rhodesiense*, die beide in Afrika die Schlafkrankheit auslösen, und *Trypanosoma cruzi*, das in Südamerika die Chagas-Krankheit auslöst.

**[0055]** Beide Erkrankungsarten sind durch Parasitämie- und Fieberanfälle gekennzeichnet. Die Schädigung der Organe wird durch von den Parasiten freigesetzte Toxine verursacht.

**[0056]** Der häufigste Überträger der die Schlafkrankheit auslösenden Trypanosomen ist die Tsetse-Fliege *Glossina* sp. Die Art, die humane afrikanische Trypanosomiasis (Schlafkrankheit) auslöst, infiziert auch Wildtiere und ist von diesen Tieren auf Menschen übertragbar (Zoonosen).

**[0057]** Bei Menschen wird *Trypanosoma cruzi* sowohl in intrazellulärer Form, als Amastigot, als auch in Form von Trypomastigoten im Blut gefunden. Der Überträger der Chagas-Krankheit ist eine "echte Wanze" (Hemiptera), wie z. B. *Triatoma*, *Rhodnius* oder *Panstrongylus*, die Amastigoten oder Trypomastigoten bei der Nahrungsaufnahme aufnimmt. Im Überträger vermehrt sich der Parasit ungeschlechtlich, und im hinteren Darm des Überträgers werden metazyklische Trypomastigoten gefunden. Der Überträger entleert seinen Darm auf der Haut des Wirts gleichzeitig mit seiner Nahrungsaufnahme, und die metazyklischen Trypomastigoten treten in den Körper des Wirts ein, am häufigsten, indem sie in die Bissstelle des Überträgers oder die Augen-, Nasen- oder Mundschleimhäute "hineingerieben" werden. Beim menschlichen Wirt beeinträchtigt die Chagas-Krankheit vor allem das Nervensystem und das Herz, mitunter jedoch auch die Leber, die Milz, die Knochen und das Verdauungssystem. Chronische Infektionen führen zu verschiedenen neurologischen Störungen einschließlich Demenz, Megakolon und Megaösophagus und der Schädigung des Herzmuskels. Unbehandelt ist die Chagas-Krankheit häufig tödlich.

**[0058]** Die hauptsächlich zur Behandlung der Schlafkrankheit verwendeten herkömmlichen Arzneimittel sind Suramin und Pentamidin. Herkömmliche Arzneimittel für die Chagas-Krankheit sind Primaquin, Puromycin und Nitrofurantoin-Derivate, aber keines dieser Arzneimittel ist bei der Behandlung dieses Zustandes nachgewiesenermaßen wirksam.

**[0059]** Nicht einschränkende Beispiele für *Trypanosoma*-Arten sind *Trypanosoma cruzi* (Auslöser der Chagas-Krankheit), *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* und *Trypanosoma evansi*.

#### Plasmodium-Malaria

**[0060]** Malaria ist eine der häufigsten tödlich verlaufenden Erkrankungen weltweit, die schätzungsweise ein bis zwei Millionen Todesfälle pro Jahr verursacht. Malaria wird von verschiedenen Plasmodia-Arten ausgelöst. Die weibliche Anopheles-Mücke injiziert Sporozoiten, die sich in der Leber zu Merozoiten entwickeln können. Die Merozoiten infizieren rote Blutzellen, und in den roten Blutzellen wachsen die Merozoiten und bewirken schließlich, dass die Zelle reißt und mehr Merozoiten freisetzt, von denen die meisten weitere rote Blutzellen infizieren und den Zyklus wiederholen. Einige Merozoiten entwickeln sich zu Gametocyten, welche die weibliche Anopheles-Mücke infizieren.

**[0061]** Das Reißen der Blutzellen und die Freisetzung von Merozoiten verursachen das mit Malaria verbundene Fieber. Die Häufigkeit der Fieberanfälle hängt von der Plasmodium-Art ab. *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* bewirken das Reißen der roten Blutzellen nach 48 Std., und der Malaria-Patient leidet daher jeden dritten Tag an heftigen Fieberanfällen. *Plasmodium malariae* bewirkt das Reißen roter Blutzellen alle 72 Std.

#### Entamoeba histolytica

**[0062]** Dieser einzellige Parasit infiziert den unteren Darm und verursacht häufig Amöbenruhr. Unbehandelt kann diese zum Tod führen. Diese Amöbe ist nicht auf den Dickdarm beschränkt, sondern kann sich auf andere weiche Organe, insbesondere die Leber, ausbreiten, wo sie im Laufe weniger Jahre große Abszesse hervorrufen kann. Menschen infizieren sich durch die Aufnahme der Amöbenzyste in verunreinigter Nahrung oder



verunreinigtem Wasser.

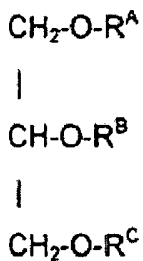
#### Der östliche Leberegel

**[0063]** Der Lebenszyklus des östlichen Leberegels *Clonorchis sinensis* beginnt mit einem Miracidium, das eine Schnecke infiziert. In der Schnecke entwickelt sich das Miracidium zu einer Zerkarie. Die Zerkarie verlässt die Schnecke und durchdringt die Haut eines Fisches. In dem Fisch nistet sich die Zerkarie im Muskelgewebe ein, und wenn der Fisch roh oder nicht durchgegart gegessen wird, wird der unreife Wurm freigesetzt und wandert in die Leber, wo er sich voll ausbildet und eine Schädigung der Leber bewirkt.

#### Lipid-Derivate

**[0064]** Die auf Lipiden basierenden Abgabesysteme (Liposomen oder Mizellen) beruhen auf Lipid-Derivaten, die aufweisen: (a) eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen und ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen und (b) einen hydrophilen Rest, wobei das Prodrug ferner ein Substrat für extrazelluläre Phospholipase A2 ist, in dem Maße, dass das organische Radikal hydrolytisch abgespalten werden kann, wohingegen die aliphatische Gruppe im Wesentlichen unangegriffen bleibt, wodurch der Arzneimittel-Wirkstoff in Form eines Lysolipid-Derivats freigesetzt wird, das kein Substrat für Lysophospholipase ist.

**[0065]** Obwohl die Begriffe "Lipid" und "Lysolipid" (im Kontext von Phospholipiden) dem Fachmann wohlbekannte Begriffe sind, sollte betont werden, dass in der vorliegenden Beschreibung und den vorliegenden Ansprüchen der Begriff "Lipid" Triester von Glycerol gemäß der folgenden Formel bedeuten soll:



wobei  $\text{R}^{\text{A}}$  und  $\text{R}^{\text{B}}$  Fettsäurekomponenten ( $\text{C}_{9-30}$ -Alkyl/Alkylen/Alkyldien/Alkyltrien/Alkyltetraen-C(=O)-) sind und  $\text{R}^{\text{C}}$  eine Phosphatidsäure ( $\text{PO}_2\text{-OH}$ ) oder ein Derivat von Phosphatidsäure ist. Somit sind die Gruppen  $\text{R}^{\text{A}}$  und  $\text{R}^{\text{B}}$  an die Glycerol-Hauptkette über Ester-Bindungen gebunden.

**[0066]** Der Begriff "Lysolipid" soll ein Lipid bedeuten, bei dem die Fettsäuregruppe  $\text{R}^{\text{B}}$  fehlt (z. B. hydrolytisch abgespalten ist), d. h. ein Glycerol-Derivat gemäß der vorstehenden Formel, wobei  $\text{R}^{\text{B}}$  Wasserstoff ist, die anderen Substituenten aber im Wesentlichen unangegriffen sind. Die Umwandlung eines Lipids in ein Lysolipid kann bei der Einwirkung eines Enzyms, insbesondere bei der Einwirkung zellulärer sowie extrazellulärer  $\text{PLA}_2$ , erfolgen.

**[0067]** Die Begriffe "Lipid-Derivat" und "Lysolipid-Derivat" sollen mögliche Derivate der vorstehenden möglichen Verbindungen in den Gruppen "Lipid" bzw. "Lysolipid" abdecken. Beispiele für biologisch wirksame Lipid-Derivate und Lysolipid-Derivate sind in Houlihan et al., *Med. Res. Rev.*, 15, 3, 157–223 angegeben. Somit sollte, wie offensichtlich ist, die Erweiterung "Derivat" im weitesten Sinne verstanden werden.

**[0068]** In der vorliegenden Anmeldung sollten Lipid-Derivate und Lysolipide jedoch bestimmte Funktionskriterien (siehe oben) und/oder Strukturanforderungen erfüllen. Es ist besonders relevant zu beachten, dass die geeigneten Lipid-Derivate solche sind, die aufweisen: (a) eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7, vorzugsweise mindestens 9, Kohlenstoffatomen und ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen und (b) einen hydrophilen Rest. Es ist offensichtlich, dass die aliphatische Gruppe und das organische Radikal den zwei Fettsäurekomponenten in einem normalen Lipid entsprechen und dass der hydrophile Rest dem Phosphat-Teil eines (Phospho)Lipids oder eines Bioisosteren davon entspricht.

**[0069]** Somit ist ein Element der der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Idee, das erhöhte Aktivitätsniveau extrazellulärer  $\text{PLA}_2$  in örtlich beschränkten Bereichen des Körpers eines Säugetiers, insbesondere Bereichen mit parasitärer Infektion, auszunutzen; die im Rahmen der vorliegenden Erfindung nutzbaren Lipid-Derivate sollten Substrate für extrazelluläre  $\text{PLA}_2$  sein, d. h. die Lipid-Derivate sollten die hydrolytische, enzymatische Abspaltung des der Fettsäure an der Position 2 eines Lipids entsprechenden organischen Radikals

durchlaufen können. Extrazelluläre PLA<sub>2</sub> gehört bekanntermaßen zur Enzymklasse (EU) 3.1.1.4. Somit sollten bei Bezugnahme auf (extrazelluläre) PLA<sub>2</sub> alle extrazellulären Enzyme dieser Klasse verstanden werden, z. B. Lipasen, welche die hydrolytische Abspaltung des der Fettsäure an der Position 2 eines Lipids entsprechenden organischen Radikals auslösen können. Ein besonderer Vorteil des auf Lipiden basierenden Abgabesystems (als Liposomen und Mizellen) ist, dass die auf organisierte Substrate gerichtete Aktivität extrazellulärer PLA<sub>2</sub> wesentlich erhöht ist, verglichen mit monomeren Substraten.

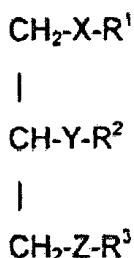
**[0070]** Angesichts der Anforderung der Hydrolysierbarkeit durch extrazelluläre PLA<sub>2</sub> ist klar, dass das organische Radikal (z. B. aliphatische Gruppe) vorzugsweise über eine Ester-Funktionalität gebunden ist, die durch extrazelluläre PLA<sub>2</sub> spaltbar ist, vorzugsweise so, dass die abgespaltene Gruppe eine Carbonsäure ist.

**[0071]** Ferner ist ein wichtiges Merkmal, dass die aliphatische Gruppe (die der Fettsäure an der Position 1 eines Lipids entsprechende Gruppe) des Lipid-Derivats, d. h. das Lysolipid-Derivat nach der Spaltung durch extrazelluläre PLA<sub>2</sub>, durch die Wirkung extrazellulärer PLA<sub>2</sub> im Wesentlichen nicht angegriffen wird. Mit "im Wesentlichen nicht angegriffen" ist gemeint, dass die Integrität der aliphatischen Gruppe bewahrt wird und dass weniger als 1 Mol-%, vorzugsweise weniger als 0,1 Mol-%, der aliphatischen Gruppe (der aliphatischen Gruppe an der Position 1) bei der Einwirkung extrazellulärer PLA<sub>2</sub> abgespalten wird.

**[0072]** Auch sollte das Lysolipid-Derivat, das aus der hydrolytischen Abspaltung des organischen Radikals resultiert, selbst kein Substrat für Lysophospholipase sein. Lysophospholipase gehört bekanntermaßen zur Enzymklasse (EU) 3.1.1.5. Somit sollten bei Bezugnahme auf Lysophospholipase alle Enzyme dieser Klasse verstanden werden, welche die Reaktion(Lyso)Phospholipid + Wasser = Phosphoglycerol + Fettsäure katalysieren. Der Ausdruck "kein Substrat für Lysophospholipase" soll bedeuten, dass Lysophospholipase eine auf das Substrat gerichtete Aktivität von weniger als 1% aufweist, verglichen mit dem entsprechenden Esterlipid, d. h. praktisch keine enzymatische Aktivität.

**[0073]** Geeignete Beispiele für solche Lysolipid-Derivate sind solche, die bei der Einwirkung von Lysophospholipasen keine hydrolytische Spaltung durchlaufen. Somit sind die Lysolipid-Derivate insbesondere keine Lysolipide und Lysolipid-Derivate mit einer Ester-Bindung an der Position 1 des Lysolipids oder der Position eines Lysolipid-Derivats, die der Position 1 eines Lysolipids entspricht.

**[0074]** Eine bevorzugte Klasse von Lipid-Derivaten zur Inkorporierung in die auf Lipiden basierenden Abgabesysteme ist durch die folgende Formel darstellbar:



wobei

X und Z unabhängig ausgewählt sind aus O, CH<sub>2</sub>, NH, NMe, S, S(O) und S(O)<sub>2</sub>, vorzugsweise aus O, NH, NMe und CH<sub>2</sub>, insbesondere O,

Y -OC(O)- ist, wobei Y dann mit R<sup>2</sup> entweder über das Sauerstoff- oder das Carbonyl-Kohlenstoffatom, vorzugsweise über das Carbonyl-Kohlenstoffatom, verbunden ist,

R<sup>1</sup> eine aliphatische Gruppe gemäß der Formel Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup> ist,

R<sup>2</sup> ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen ist, wie z. B. eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7, vorzugsweise mindestens 9, Kohlenstoffatomen, vorzugsweise eine Gruppe gemäß der Formel Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup>,

wobei Y<sup>1</sup> -(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>-(CH=CH)<sub>n2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>-(CH=CH)<sub>n4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n5</sub>-(CH=CH)<sub>n6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n7</sub>-(CH=CH)<sub>n8r</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n9</sub> ist und die Summe von n<sub>1</sub> + 2n<sub>2</sub> + n<sub>3</sub> + 2n<sub>4</sub> + n<sub>5</sub> + 2n<sub>6</sub> + n<sub>7</sub> + 2n<sub>8</sub> + n<sub>9</sub> eine ganze Zahl von 9 bis 29 ist, n<sub>1</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 29 ist, n<sub>3</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist, n<sub>5</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 17 ist, n<sub>7</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 14 ist und n<sub>9</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 11 ist und n<sub>2</sub>, n<sub>4</sub>, n<sub>6</sub> und n<sub>8</sub> unabhängig jeweils Null oder 1 sind und Y<sup>2</sup> CH<sub>3</sub> oder CO<sub>2</sub>H ist, wobei jedes Y<sup>1</sup>-Y<sup>2</sup> unabhängig mit Halogen oder C<sub>1-4</sub>-Alkyl substituiert sein kann, Y<sup>1</sup>-Y<sup>2</sup> aber vorzugsweise nicht substituiert ist, R<sup>3</sup> ausgewählt ist aus Phosphatidsäure (PO<sub>2</sub>-OH), Derivaten von Phosphatidsäure und Bioisosteren von Phosphatidsäure und Derivaten davon.

**[0075]** Wie vorstehend erwähnt, implizieren bevorzugte Ausführungsformen, dass Y -OC(O)- ist, wobei Y mit R<sup>2</sup> über das Carboxyl-Atom verbunden ist. Die am meisten bevorzugten Ausführungsformen implizieren, dass X und Z O sind und dass Y -OC(O)- ist, wobei Y mit R<sup>2</sup> über das Carboxyl-Atom verbunden ist. Dies bedeutet, dass das Lipid-Derivat eine Verbindung in der Art eines 1-Monoether-2-Monoester-Phospholipids ist.

**[0076]** Eine weitere bevorzugte Gruppe von Lipid-Derivaten ist diejenige, bei der die Gruppe X S ist.

**[0077]** Bei einer Ausführungsform sind R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> aliphatische Gruppen gemäß der Formel Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup>, wobei Y<sup>2</sup> CH<sub>3</sub> oder CO<sub>2</sub>H, vorzugsweise aber CH<sub>3</sub>, ist und wobei Y<sup>1</sup> -(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>-(CH=CH)<sub>n2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>-(CH=CH)<sub>n4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n5</sub>-(CH=CH)<sub>n6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n7</sub>-(CH=CH)<sub>n8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n9</sub> ist, die Summe von n1 + 2n2 + n3 + 2n4 + n5 + 2n6 + n7 + 2n8 + n9 eine ganze Zahl von 9 bis 23 ist, d. h. die aliphatische Gruppe Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup> eine Länge von 10–24 Kohlenstoffatomen aufweist, n1 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 23 ist, n3 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist, n5 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 17 ist, n7 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 14 ist und n9 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 11 ist und n2, n4, n6 und n8 unabhängig jeweils Null oder 1 sind.

**[0078]** Bei einer Ausführungsform schließt/schließen eine oder mehrere der aliphatischen Gruppen R<sup>1</sup>/R<sup>2</sup> oder der R<sup>3</sup>-Gruppen eine Markierung ein, z. B. Halogene (Brom, Iod) oder Bariumatome, die besonders für die Bilderzeugung mittels Computertomographie (CT) geeignet sind, oder sind mit instabilen Isotopen angereichert, z. B. <sup>11</sup>C, das besonders nützlich für Zwecke des PET-Scannings ist.

**[0079]** Obwohl die aliphatischen Gruppen ungesättigt und sogar mit Halogenen (Fluor, Chlor, Brom, Iod) und C<sub>1-4</sub>-Gruppen (d. h. verzweigte aliphatische Gruppen bildend) substituiert sein können, sind die aliphatischen Gruppen wie R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> bei einer Ausführungsform vorzugsweise sowohl gesättigt als auch unverzweigt, d. h. sie weisen vorzugsweise keine Doppelbindungen zwischen benachbarten Kohlenstoffatomen auf, wobei dann n2, n4, n6 und n8 jeweils Null sind. Demgemäß ist Y<sup>1</sup> vorzugsweise (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>. Noch bevorzugter sind (bei dieser Ausführungsform) R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> unabhängig jeweils (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>CH<sub>3</sub> und am meisten bevorzugt (CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub> oder (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CH<sub>3</sub>. Bei alternativen Ausführungsformen können die Gruppen eine oder mehrere Doppelbindung(en) aufweisen, d. h. sie können ungesättigt sein, und eines oder mehrere von n2, n4, n6 und n8 kann/können gleich 1 sein. Wenn z. B. der ungesättigte Kohlenwasserstoff eine Doppelbindung aufweist, ist n2 gleich 1, n4, n6 und n8 sind jeweils gleich Null und Y<sup>1</sup> ist (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>. n1 ist gleich Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 21, und n3 ist ebenfalls Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 20, wobei mindestens eines von n1 oder n3 nicht gleich Null ist.

**[0080]** Bei einer besonderen Ausführungsform sind die Lipid-Derivate solche, die Monoetherlipide sind, wobei X und Z O sind, R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> unabhängig ausgewählt sind aus Alkylgruppen, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, wobei n 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 oder 29, vorzugsweise 14, 15 oder 16, insbesondere 14, ist, Y -OC(O)- ist, wobei Y dann mit R<sup>2</sup> über das Carbonyl-Kohlenstoffatom verbunden ist.

**[0081]** Bezüglich des hydrophilen Rests (häufig als "Kopfgruppe" bezeichnet), die R<sup>3</sup> entspricht, wird angenommen, dass eine breite Vielzahl von Phosphatidsäure (PO<sub>2</sub>-OH), Derivaten von Phosphatidsäure und Biososteren von Phosphatidsäure und Derivaten davon entsprechenden Gruppen verwendbar ist. Wie offensichtlich ist, ist die entscheidende Anforderung an R<sup>3</sup>, dass die Gruppen eine enzymatische Abspaltung der R<sup>2</sup>-Gruppe (tatsächlich R<sup>2</sup>-C(=O) oder R<sup>2</sup>-OH) durch extrazelluläre PLA<sub>2</sub> zulassen. "Biosostere von Phosphatidsäure und Derivate davon" schließt tatsächlich ein, dass solche Gruppen – wie Phosphatidsäure – die enzymatische Abspaltung durch extrazelluläre PLA<sub>2</sub> zulassen sollten.

**[0082]** R<sup>3</sup> wird typischerweise ausgewählt aus Phosphatidsäure (PO<sub>2</sub>-OH), Phosphatidylcholin (PO<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), Phosphatidylethanolamin (PO<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), N-Methylphosphatidylethanolamin (PO<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub>), Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylglycerol (PO<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OH). Weitere mögliche Derivate von Phosphatidsäure sind solche, bei denen Dicarbonsäuren, wie z. B. Glutar-, Sebacin-, Bernstein- und Weinsäure, mit dem End-Stickstoff von Phosphatidylethanolaminen, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol etc. verknüpft sind.

**[0083]** Ein hoch interessanter Aspekt ist die Möglichkeit, die pharmazeutische Wirkung des Lipid-Derivats durch Modifikation der R<sup>2</sup>-Gruppe zu modifizieren. Es sollte klar sein, dass R<sup>2</sup> ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen (wie z. B. eine aliphatische Gruppe mit einer bestimmten Länge (mindestens 7, vorzugsweise 9, Kohlenstoffatome)) sein sollte; es ist ein hoher Variabilitätsgrad möglich, z. B. muss R<sup>2</sup> nicht unbedingt ein langkettiger Rest sein, sondern kann komplexere Strukturen aufweisen.

**[0084]** Es wird im Allgemeinen angenommen, dass  $R^2$  entweder für die Umgebung, in der es durch extrazelluläre  $PLA_2$  freigesetzt wird, relativ inert sein kann oder dass  $R^2$  eine aktive pharmazeutische Rolle spielen kann, typischerweise als unterstützendes Antiparasitikum, wie z. B. Allopurinol, Amodiaquin, Amphotericin, Antifolate, die Kombination Artemether + Benflumetol, Artemisinin, Derivate, Chlorproguanil, Chloroquin, die Kombination von Atovaquon und Proguanil HCL (Handelsname Malarone™), Dapson, Doxycyclin, Halofantrin, Interferon-Gamma, Licochalcon A, Mefloquin, Megluminantimonat, Metronidazol, Nitrofurantoin-Derivate, Paromomycin, Pentamidin, Primaquin, Proguanil (Chloroquin plus Proguanil), Puromycin, Pyrimethamin, Pyronaridin, Chinin und Natriumstibogluconat, oder als Wirksamkeitsmodifikator für das Lysolipid-Derivat und/oder beliebige weitere (zweite) Stoffe, die in der Umgebung vorhanden sind.

**[0085]** Bei einer Ausführungsform schließt/schließen eine oder mehrere der aliphatischen Gruppen  $R^1/R^2$  oder der  $R^3$ -Gruppen eine Markierung ein, z. B. Halogene (Brom, Iod) oder Bariumatome, die besonders für die Bilderzeugung mittels Computertomographie (CT) geeignet sind, oder sind mit instabilen Isotopen angereichert, z. B.  $^{11}C$ , das besonders nützlich für Zwecke des PET-Scannings ist.

**[0086]** Bei einigen Ausführungsformen ist die  $R^2$ -Gruppe ein langkettiger Rest, z. B. ein Fettsäurerest (die Fettsäure schließt ein Carbonyl aus der Gruppe Y ein). Dies ist vorstehend detailliert beschrieben worden. Interessante Beispiele für Arzneimittelhilfsstoffe als  $R^2$  in diesen Untergruppen sind mehrfach ungesättigte Säuren, z. B. Oleat, Linol-, Linolensäure, sowie Derivate von Arachidonoyl (einschließlich das Carbonyl aus Y), z. B. Prostaglandine, wie z. B. Prostaglandin  $E_1$ , da Arachidonsäure-Derivate bekannte Regulatoren der Hormonwirkung einschließlich der Wirkung von Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen sind. Beispiele für Wirksamkeitsmodifikatoren als  $R^2$  sind solche, welche die Durchlässigkeit der Ziel-Zellmembran steigern sowie die Aktivität extrazellulärer  $PLA_2$  oder des Arzneimittel-Wirkstoffs oder beliebiger zweiter Arzneimittel steigern. Beispiele hierfür sind kurzkettige ( $C_{8-12}$ ) Fettsäuren.

**[0087]** Es ist jedoch auch vorgesehen, dass weitere Gruppen als organisches Radikal  $R^2$  nützlich sein könnten, z. B. Vitamin D-Derivate, Steroid-Derivate, Retinoesäure (einschließlich all-trans-Retinoesäure, all-cis-Retinoesäure, 9-cis-Retinoesäure, 13-cis-Retinoesäure), Cholecalciferol- und Tocopherol-Analoga, pharmazeutisch wirksame Carbonsäuren, wie z. B. verzweigt-kettige aliphatische Carbonsäuren (z. B. Valproinsäure und die in der WO 99/02485 beschriebenen), Salicylsäuren (z. B. Acetylsalicylsäure), steroidale Carbonsäuren (z. B. Lyserg- und Isolysergsäure), monoheterozyklische Carbonsäuren (z. B. Nicotinsäure) und polyheterozyklische Carbonsäuren (z. B. Penicilline und Cephalosporine), Diclofenac, Indomethazin, Ibuprofen, Naproxen, 6-Methoxy-2-naphthyllessigsäure.

**[0088]** Es sollte verstanden werden, dass die verschiedenen Beispiele für mögliche  $R^2$ -Gruppen mit dem Namen einer konkreten Spezies statt dem Namen des Radikals bezeichnet sind. Ferner sollte klar sein, dass die möglichen Beispiele die Carbonyl-Gruppe oder Oxy-Gruppe der Bindung einschließen können, über die das organische Radikal mit dem Lipid-Gerüst ("Y" in der vorstehenden Formel entsprechend) verbunden ist. Dies ist für den Fachmann natürlich klar.

**[0089]** Obwohl es in der allgemeinen Formel für die geeigneten Beispiele von im Rahmen der Erfindung zu verwendenden Lipid-Derivaten nicht speziell angegeben wurde, sollte klar sein, dass die Glykol-Komponente der Lipid-Derivate substituiert sein kann, z. B. um die Spaltungsgeschwindigkeit durch extrazelluläre  $PLA_2$  zu modifizieren oder einfach um die Eigenschaften der die Lipid-Derivate umfassenden Liposomen zu modifizieren.

#### Lipid-Derivate als Prodrugs

**[0090]** Wie vorstehend beschrieben, stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung eines auf Lipiden basierenden Abgabesystems zur Verabreichung eines Arzneimittel-Wirkstoffs, ausgewählt aus Lysolipid-Derivaten, bereit, wobei der Arzneimittel-Wirkstoff in dem auf Lipiden basierendem System in Form eines Prodrug vorliegt, wobei das Prodrug ein Lipid-Derivat ist, das aufweist: (a) eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen und ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen und (b) einen hydrophilen Rest, wobei das Prodrug ferner ein Substrat für extrazelluläre Phospholipase A2 ist, in dem Maße, dass das organische Radikal hydrolytisch abgespalten werden kann, wohingegen die aliphatische Gruppe im Wesentlichen unangegriffen bleibt, wodurch der Arzneimittel-Wirkstoff in Form eines Lysolipid-Derivats freigesetzt wird, das kein Substrat für Lysophospholipase ist, zur Behandlung und/oder Verhinderung parasitärer Infektionen bei Säugetieren.

**[0091]** Typische parasitäre Infektionen bei Säugetieren sind solche, bei denen die Leber, die Milz und das

Knochenmark betroffen sind.

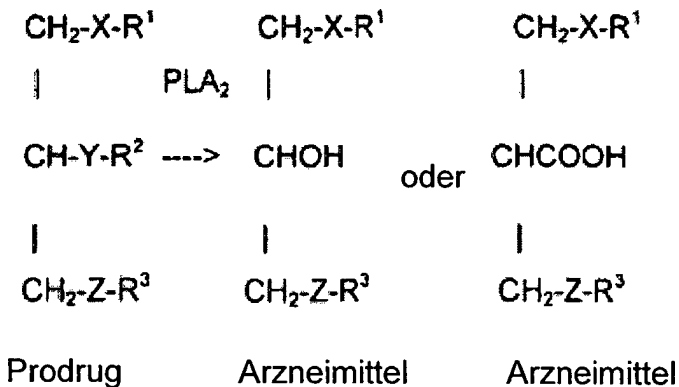
**[0092]** Mit dem Begriff "Arzneimittel-Wirkstoff" ist jedes chemische Gebilde gemeint, das im Körper eines Säugetiers, insbesondere eines Menschen, eine prophylaktische oder therapeutische Wirkung bereitstellt.

**[0093]** Der Begriff "Prodrug" sollte im normalen Sinne verstanden werden, nämlich als ein Arzneimittel, das maskiert oder geschützt ist, damit es (typischerweise durch Spaltung, aber auch durch chemische Umwandlung in vivo) in das beabsichtigte Arzneimittel umgewandelt wird. Der Fachmann wird den Umfang des Begriffs "Prodrug" erkennen.

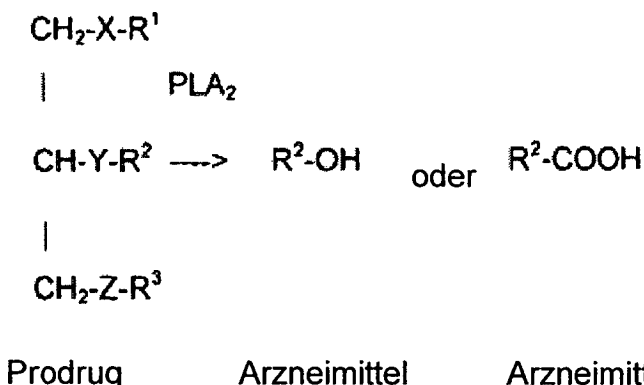
**[0094]** Der Arzneimittel-Wirkstoff ist aus Lysolipid-Derivaten ausgewählt, und wie der vorliegenden Beschreibung mit Ansprüchen zu entnehmen ist, haben die Lysolipid-Derivate eine therapeutische Wirkung – zumindest – im Zusammenhang mit parasitären Infektionen, bei denen ein örtlich begrenzter Bereich des Körpers des Säugetiers ein durch die parasitäre Infektion ausgelöstes Aktivitätsniveau extrazellulärer PLA<sub>2</sub> aufweist, der das Lysolipid-Derivat freisetzen kann.

**[0095]** Wie der vorliegenden Beschreibung mit Ansprüchen zu entnehmen ist, stellt das Lipid-Derivat häufig das vorstehend bezeichnete Prodrug dar, und das Lysolipid-Derivat stellt dadurch den Arzneimittel-Wirkstoff dar, oft ein Monoetherlysolipid-Derivat. Es sollte jedoch klar sein, dass dies nicht die Möglichkeit ausschließt, weitere Arzneimittel, die als zweite Arzneimittel bezeichnet werden, in die auf Lipiden basierenden Abgabesysteme einzuschließen, noch ausschließt, dass das organische Radikal, das durch die Wirkung extrazellulärer PLA<sub>2</sub> hydrolytisch abgespalten werden kann, eine bestimmte pharmazeutische Wirkung (z. B. als ein Arzneimittelhilfsstoff oder Wirksamkeitsmodifikator, wie an anderer Stelle hierin beschrieben) haben kann oder als Markierung wirken kann. Ferner muss die pharmazeutische Wirkung des "Arzneimittel-Wirkstoffs", d. h. des Lysolipid-Derivats, nicht die vorherrschende sein, wenn ein zweites Arzneimittel eingeschlossen ist; tatsächlich kann die Wirkung des zweiten Arzneimittels sehr wohl die vorherrschende sein, wie bei der anderen Hauptausführungsform (siehe "Lipid-Derivat-Liposomen als Arzneimittelabgabesysteme", nachstehend) klar wird.

**[0096]** Es wird angenommen, dass die Freisetzung des Arzneimittel-Wirkstoffs (Lipolipid-Derivat) aus dem Prodrug (Lipid-Derivat) erfolgt wie im folgenden Beispiel illustriert:



**[0097]** Ferner kann es sich bei dem Substituenten R<sup>2</sup> um einen Arzneimittelhilfsstoff oder einen Wirksamkeitsmodifikator für den Arzneimittel-Wirkstoff handeln, und er wird gleichzeitig bei der Einwirkung extrazellulärer PLA<sub>2</sub> freigesetzt:



**[0098]** Es ist vorstehend unter der Definition von R<sup>2</sup> beschrieben worden, wie die Gruppe R<sup>2</sup> verschiedene

unabhängige oder synergistische Wirkungen im Zusammenhang mit dem Arzneimittel-Wirkstoff haben kann, z. B. als Arzneimittelhilfsstoff oder Wirksamkeitsmodifikator, z. B. Durchlässigkeits- oder Zytolysemodifikator. Es sollte bedacht werden, dass die R<sup>2</sup> entsprechenden Gruppen (z. B. R<sup>2</sup>-OH oder R<sup>2</sup>-COOH) eine pharmazeutische Wirkung haben könnten, der bezogen auf die Wirkung des Lysolipid-Derivats (Arzneimittel-Wirkstoff) vorherrschend ist.

#### Als Liposomen und Mizellen formulierte Lipid-Derivate

**[0099]** Der Begriff "auf Lipiden basierendes Arzneimittelabgabesystem" sollte makromolekulare Strukturen einschließen, die als Hauptbestandteil Lipid oder Lipid-Derivate einschließen. Geeignete Beispiele hierfür sind Liposomen und Mizellen. Zurzeit wird angenommen, dass Liposomen den breitesten Anwendungsumfang bieten, und diese werden nachfolgend am detailliertesten beschrieben. Obwohl zurzeit angenommen wird, dass Liposomen das bevorzugte auf Lipiden basierendes System sind, wird angenommen, dass auch Mizellensysteme interessante Ausführungsformen im Rahmen der vorliegenden Erfindung bieten.

**[0100]** Wenn hierin verwendet, soll der Begriff "Markierung" eine Spezies bedeuten, die dem Säugetierkörper verabreicht und durch extrakorporale Mittel zum Abbilden lebenden Gewebes nachgewiesen werden kann. Die Markierung kann aus radioaktiven Markierungen ausgewählt werden, wie z. B. Radioisotope und mit Radioisotopen markierte Verbindungen, strahlenundurchlässige Verbindungen, fluoreszierende Verbindungen etc. Konkretere Markierungen sind <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc, <sup>67</sup>Ga, <sup>11</sup>C, Gd, Mn, Eisenoxid, Argon, Stickstoff, Iod, Brom und Barium.

**[0101]** Geeignete Markierungen für die Gamma-Szintigraphie sind diagnostische Radionuklide, wie z. B. <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc, <sup>67</sup>Ga. Für praktische Zwecke werden die Radionuklide in einen Komplex überführt, z. B. mit Chelatbildnern, wie z. B. Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), Hexamethylpropylenaminoxim (HMPAO), Diisopropyliminodiessigsäure (DISIDA) oder sogar Proteinen, wie z. B. humanes Serumalbumin (HSA). Alternativ können DTPA oder ähnliche chelatbildende Verbindungen durch die Inkorporierung einer hydrophobischen Gruppe derivatisiert werden, welche die chelatbildende Komponente während oder nach der Liposomenherstellung auf der Liposomenoberfläche verankern können.

**[0102]** Geeignete Markierungen für das Röntgen sind Verografin, Ioxaglat, Iopromid, Iomeprol, Iopamidol, Iopentol, Iodixanol, Ioversol, verschiedene nichtionische Kontrastmittel etc., die in Liposomen inkorporiert und sowohl für die plane Röntgenabbildung der Leber und der Milz als auch für die Bilderzeugung mittels CT verwendet werden können.

**[0103]** Geeignete Markierungen für die Bilderzeugung mittels Magnetresonanz (MR) sind paramagnetische Ionen, wie z. B. Gd und Mn, und an verschiedene Trägermoleküle gekoppeltes Eisenoxid. Der Gadoliniumdiethylentriaminpentaessigsäure-(Gd-DTPA-)Komplex ist z. B. nachgewiesenermaßen ein wirksames Kontrastmittel für die Abbildung von Leber, Milz und Lebermetastasen mittels MR.

**[0104]** Geeignete Markierungen für die Bilderzeugung mittels Computertomographie (CT) sind Iod, Brom Barium etc.

**[0105]** Weitere Beispiele für geeignete Markierungen sind oft durch das ausgewählte Bilderzeugungs- oder Nachweisverfahren gegeben; Beispiele hierfür sind detailliert beschrieben in: Handbook of Medical Imaging, Bd. 1, 2 und 3, SPIE Press, Washington USA, 2000, Hg. Beutel, Kondon und van Metter.

**[0106]** Die Markierung kann so angepasst werden, dass sie nachweisbar und optional quantifizierbar ist durch ein Nachweisverfahren, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Positronenemissionstomographie (PET), Röntgen, Gamma-Szintigraphie, Bilderzeugung mittels Magnetresonanz (MR), Bilderzeugung mittels Computertomographie (CT) und Ultraschall.

**[0107]** Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung eines Bildverbesserungssystems (Liposomen oder Mizellen), das auf einem Lipid-Derivat basiert, das aufweist: (a) eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen und ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen und (b) einen hydrophilen Rest, wobei die mit Lipiden konjugierten Kontrastmittel ferner ein Substrat für extrazelluläre Phospholipase A2 sind, in dem Maße, dass das organische Radikal hydrolytisch abgespalten werden kann, wohingegen die aliphatische Gruppe im Wesentlichen unangegriffen bleibt, wodurch das mit Lipiden konjugierte Kontrastmittel in Form eines Lysolipid-Derivats freigesetzt wird, das kein Substrat für Lysophospholipase ist.

**[0108]** Bei einer wichtigen Variante, die vorteilhaft mit den hierin beschriebenen Ausführungsformen kombinierbar ist, ist das Lipid-Derivat (z. B. das Prodrug) entweder als einziger Bestandteil oder – was üblicher ist – in Kombination mit weiteren Bestandteilen (weitere Lipide, Sterole etc.) in Liposomen eingeschlossen. Somit liegen die hierin beschriebenen auf Lipiden basierenden Systeme vorzugsweise in Form von Liposomen vor, wobei die Liposomen aus Schichten aufgebaut sind, die das Lipid-Derivat (z. B. ein Prodrug) umfassen.

**[0109]** "Liposomen" sind als sich selbst organisierende Strukturen bekannt, die eine oder mehrere Lipid-Doppelschicht(en) umfassen, die jeweils einen wässrigen Raum umschließt/umschließen und zwei entgegengesetzte monomolekulare Schichten aus amphiphilen Lipid-Molekülen umfasst/umfassen. Amphiphile Lipide (hierin u. a. Lipid-Derivate) umfassen einen polaren (hydrophilen) Kopfgruppen-Bereich (entsprechend dem Substituenten  $R^3$  bei den Lipid-Derivaten), der kovalent an eine oder zwei nicht-polare (hydrophobische) aliphatische Gruppe(n) (entsprechend  $R^1$  und  $R^2$  bei den Lipid-Derivaten) gebunden ist. Es wird im Allgemeinen angenommen, dass energetisch ungünstige Kontakte zwischen den hydrophobischen Gruppen und dem wässrigen Medium eine Neuordnung der Lipid-Moleküle veranlassen, so dass die polaren Kopfgruppen zum wässrigen Medium hin ausgerichtet sind, während sich die hydrophobischen Gruppen wieder hin zum Inneren der Doppelschicht ausrichten. Es wird eine energetisch stabile Struktur ausgebildet, bei der die hydrophobischen Gruppen wirksam vor der Kontaktierung mit dem wässrigen Medium abgeschirmt sind.

**[0110]** Liposomen können eine einzige Lipid-Doppelschicht (unilamellare Liposomen, "ULV") oder mehrere Lipid-Doppelschichten (multilamellare Liposomen, "MLV") aufweisen und sind mittels einer Vielzahl von Verfahren herstellbar (siehe z. B. Deamer and Uster, *Liposomes*, Marcel Dekker, N. Y., 1983, 27–52). Diese Verfahren schließen ein: die Verfahren nach Bangham zur Herstellung multilamellarer Liposomen (MLV), die Verfahren nach Lenk, Fountain und Cullis zur Herstellung von MLV mit im Wesentlichen gleicher Verteilung des interlamellaren gelösten Stoffs (siehe z. B. US 4,522,803, US 4,588,578, US 5,030,453, US 5,169,637 und US 4,975,282) und das Umkehrphasenverdampfungsverfahren nach Papahadjopoulos et al. (US 4,235,871) zur Herstellung oligolamellarer Liposomen. ULV sind aus MLV herstellbar durch Verfahren wie z. B. Ultraschallbehandlung (siehe Papahadjopoulos et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 135, 624 (1968)) oder Extrudieren (US 5,008,050 und US 5,059,421). Das Liposom ist mittels der Verfahren jeder dieser Offenlegungen herstellbar, deren Inhalte durch Bezugnahme hierin eingeschlossen sind.

**[0111]** Es sind verschiedene Verfahren, wie z. B. Ultraschallbehandlung, Homogenisierung, Anwendung einer French Press und Mahlen, einsetzbar, um aus größeren Liposomen Liposomen mit geringerer Größe herzustellen. Extrudieren (siehe US 5,008,050) kann eingesetzt werden, um Liposomen zu verkleinern, d. h. Liposomen mit einer im Voraus festgelegten mittleren Größe herzustellen, indem die Liposomen unter Druck gezwungen werden, Filterporen einer definierten, ausgewählten Größe zu passieren. Tangentialflussfiltration (siehe WO 89/08846) ist ebenfalls einsetzbar, um die Größe von Liposomen zu regularisieren, d. h. um Liposomen herzustellen, die eine Liposomen-Population mit geringerer Größenheterogenität und einer homogenen, definierten Größenverteilung aufweisen. Die Inhalte dieser Dokumente sind durch Bezugnahme hierin eingeschlossen. Die Liposomengrößen sind ebenfalls mittels einer Anzahl von Verfahren, wie z. B. quasielastische Lichtstreuung, und mit Geräten, z. B. Nicomp<sup>®</sup>-Particle Sizer, bestimmbar, die dem Fachmann zur Verfügung stehen.

**[0112]** Es ist recht interessant zu bemerken, dass die Lipid-Derivate den größten Teil eines auf Lipiden basierenden Systems ausmachen können, selbst wenn dieses System ein Liposomen-System ist. Diese Tatsache resultiert aus der strukturellen (aber nicht funktionellen) Ähnlichkeit zwischen den Lipid-Derivaten und Lipiden. Es wird somit angenommen, dass die Lipid-Derivate der alleinige Bestandteil von Liposomen sein können, d. h. die Lipid-Derivate können bis zu 100 Mol-% der gesamten entwässerten Liposomen ausmachen. Dies steht im Gegensatz zu den bekannten Monoether-Lysolipiden, die nur einen kleinen Teil der Liposomen ausmachen können.

**[0113]** Wie nachstehend detailliert beschrieben, schließen Liposomen typischerweise vorteilhaft weitere Bestandteile mit oder ohne pharmazeutische Wirkung ein, die aber die Liposomen-Struktur stabilisieren (oder alternativ destabilisieren) oder die Liposomen vor Beseitigung schützen, dadurch die Zirkulationszeit verlängern und dadurch die Gesamtwirksamkeit eines das Liposom einschließenden Pharmazeutikums verbessern. Die Liposomen können auch Cofaktoren einschließen, wie z. B. Calcium, die bei einer Freisetzung die  $PLA_2$ -Aktivität erhöhen würden, sowie Lysolipide, Fettsäuren, die bekanntermaßen die  $PLA_2$ -Aktivität erhöhen.

**[0114]** Ausgehend von dem Gesagten wird angenommen, dass die besonderen Lipid-Derivate typischerweise 15–100 Mol-%, wie z. B. 50–100 Mol-%, vorzugsweise 75–100 Mol-%, insbesondere 90–100 Mol-%, basierend auf dem gesamten entwässerten Liposom, ausmachen.

**[0115]** Die Liposomen können unilamellar oder multilamellar sein. Einige bevorzugte Liposomen sind unilamellar und weisen Durchmesser von weniger als ca. 200 nm, noch bevorzugter von größer als ca. 50 nm bis kleiner als ca. 200 nm, auf.

**[0116]** Die Liposomen werden typischerweise – wie auf dem Fachgebiet bekannt – mittels eines Verfahrens hergestellt, das folgende Schritte umfasst: (a) Lösen des Lipid-Derivats in einem organischen Lösungsmittel, (b) Entfernen des organischen Lösungsmittels aus der Lipid-Derivat-Lösung von Schritt (a) und (c) Hydratisieren des Produkts von Schritt (b) mit einem wässrigen Lösungsmittel, um Liposomen auszubilden.

**[0117]** Das Verfahren kann ferner einen Schritt des Zugebens eines zweiten Stoffs (siehe unten) zu dem organischen Lösungsmittel von Schritt (a) oder zur wässrigen Phase von Schritt (c) umfassen.

**[0118]** Nachfolgend kann das Verfahren einen Schritt des Extrudierens der in Schritt (c) hergestellten Liposomen durch einen Filter umfassen, um Liposomen einer bestimmten Größe, z. B. 100 nm, herzustellen.

**[0119]** Die Lipid-Derivate umfassenden Liposomen können (im Prinzip) ausschließlich aus den Lipid-Derivaten bestehen. Um die Liposomen zu modifizieren, können jedoch auch "weitere Lipide" eingeschlossen werden. Weitere Lipide werden nach ihrer Fähigkeit ausgewählt, kompatible Packformationen mit den Lipid-Derivat-Komponenten der Doppelschicht anzunehmen, so dass alle Lipid-Bestandteile eng gepackt sind und die Freisetzung der Lipid-Derivate aus der Doppelschicht verhindert wird. Auf Lipiden basierende Faktoren, die zu kompatiblen Packformationen beitragen sind dem Fachmann gut bekannt und schließen, ohne Beschränkung, ein: Acylkettenlänge und Grad der Ungesättigtheit sowie Größe und Ladung der Kopfgruppe. Demgemäß können geeignete weitere Lipide, einschließlich verschiedener Phosphatidylethanolamine ("PE"), wie z. B. Ei-Phosphatidylethanolamin ("EPE") oder Dioleoylphosphatidylethanolamine ("DOPE"), vom Fachmann ohne übermäßiges Experimentieren ausgewählt werden. Lipide können auf verschiedene Weise modifiziert werden, z. B. durch Kopfgruppen-Derivatisierung mit Dicarbonsäuren, wie z. B. Glutar-, Sebacin-, Bernstein- und Weinsäure; vorzugsweise ist die Dicarbonsäure Glutarsäure ("GA"). Demgemäß schließen geeignete kopfgruppen-derivatisierte Lipide Phosphatidylethanolaminedicarbonsäuren ein, wie z. B. Dipalmitoylphosphatidylethanolamineglutarsäure ("DPPE-GA"), Palmitoyloleoylphosphatidylethanolamineglutarsäure ("DPPE-GA"), Palmitoyloleoylphosphatidylethanolamineglutarsäure ("POPE-GA") und Dioleoylphosphatidylethanolamineglutarsäure ("DOPE-GA"). Am meisten bevorzugt ist das derivatisierte Lipid DOPE-GA.

**[0120]** Der Gesamtgehalt der "weiteren Lipide" liegt typischerweise im Bereich von 0–30 Mol-%, insbesondere 1–10 Mol-%, basierend auf dem gesamten entwässerten Liposom.

**[0121]** In das Liposom eingeschlossene Sterolverbindungen können im Allgemeinen die Fluidität von Lipid-Doppelschichten beeinträchtigen. Demgemäß hemmen Sterol-Interaktionen mit umgebenden Kohlenwasserstoffgruppen im Allgemeinen die Emigration dieser Gruppen aus der Doppelschicht. Ein Beispiel für eine in das Liposom einzuschließende Sterolverbindung (Sterol) ist Cholesterol, aber zahlreiche weitere Sterolverbindungen sind möglich. Es wird im Allgemeinen angenommen, dass der Gehalt an Sterolverbindung, falls vorhanden, im Bereich von 0–25 Mol-%, insbesondere 0–10 Mol-%, wie z. B. 0–5 Mol-%, basierend auf dem gesamten entwässerten Liposom, liegt.

**[0122]** Obwohl ein Element der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Idee darin liegt, dass die Liposomen oder Mizellen vom RES-System aufgenommen werden sollten, kann es vorteilhaft sein, einen kleinen Anteil an Lipiden oder Lipid-Derivaten einzuschließen, an denen Polymerketten befestigt sind, um die Geschwindigkeit einzustellen, mit der die Liposomen und Mizellen aufgenommen und dadurch abgebaut werden. Es kann somit vorteilhaft sein, teilweise, aber nicht vollständig, die so genannten STEALTH®-Liposomen (Liposome Technology Inc., Menlo Park, Kalif.), die mit Polyethylenglykol (PEG) gepropfte Lipide in einer Menge von ca. 5 Mol-% des gesamten entwässerten Liposoms einschließen, oder andere hydrophile Polymerketten tragende Lipopolymere zu verwenden. Das Vorhandensein solcher Polymere auf der äußeren Liposomenoberfläche sollte die Aufnahme von Liposomen durch die Organe des RES leicht verzögern, aber nicht verhindern. Falls vorhanden, machen die Lipopolymere typischerweise 0,1–10 Mol-% des gesamten entwässerten Systems aus.

**[0123]** Hydrophile Polymere, die für die Verwendung in Lipopolymeren geeignet sind, sind solche, die leicht wasserlöslich sind, an einem Vesikel bildendem Lipid kovalent befestigt werden können und in vivo ohne toxische Wirkungen toleriert werden (d. h. biokompatibel sind). Geeignete Polymere schließen Polyethylenglykol (PEG), Polymilchsäure (auch als Polylaktid bezeichnet), Polyglykolsäure (auch als Polyglykolid bezeichnet) ein Polymilchsäure-Polyglykolsäure-Copolymer und Polyvinylalkohol ein. Bevorzugte Polymere sind solche mit ei-



nem Molekulargewicht von ca. 100 oder 120 Dalton bis zu ca. 5.000 oder 10.000 Dalton, noch bevorzugter von ca. 300 Dalton bis ca. 5.000 Dalton. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von ca. 100 bis ca. 5.000 Dalton, und noch bevorzugter mit einem Molekulargewicht von ca. 300 bis ca. 5.000 Dalton. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer Polyethylenglykol mit 750 Dalton (PEG(750)). Polymere können auch durch die Anzahl der in ihnen enthaltenen Monomere definiert werden; bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Polymere mit mindestens ca. drei Monomeren verwendet, wie z. B. aus drei Monomeren (ca. 150 Dalton) bestehende PEG-Polymere. Weitere hydrophile Polymere, die für die Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sein können, schließen ein: Polyvinylpyrrolidon, Polymethoxazolin, Polyethyloxazolin, Polyhydroxypropylmethacrylamid, Polymethacrylamid, Polydimethylacrylamid und derivatisierte Cellulosen, wie z. B. Hydroxymethylcellulose oder Hydroxyethylcellulose.

**[0124]** Glycolipide sind Lipide, an denen eine hydrophile Polysaccharid-Kette kovalent befestigt ist. Es ist klar, dass Glycolipide wie Lipopolymere verwendet werden können, obwohl die Lipopolymere zurzeit die vielversprechendsten Ergebnisse präsentieren.

**[0125]** Es wird im Allgemeinen angenommen, dass der Gehalt an Lipopolymer, falls vorhanden, vorteilhaft im Bereich von 0,1–5 Mol-%, wie z. B. 0,2–4 Mol-%, insbesondere 0,5–3 Mol-%, liegt, basierend auf dem gesamten entwässerten Liposom.

**[0126]** Noch weitere Inhaltsstoffe können 0–2 Mol-%, insbesondere 0–1 Mol-%, basierend auf dem gesamten entwässerten Liposom, ausmachen.

**[0127]** Gemäß einer Ausführungsform enthält die Lipid-Doppelschicht eines Liposoms mit Polyethylenglykol (PEG) derivatisierte Lipide, so dass sich die PEG-Ketten von der inneren Oberfläche der Lipid-Doppelschicht in den durch das Liposom eingekapselten Innenraum erstrecken und von der Außenseite der Lipid-Doppelschicht in die umgebende Umgebung erstrecken (siehe z. B. US 5,882,679).

**[0128]** Das Liposom kann entwässert, gelagert und dann so wiederhergestellt werden, dass ein wesentlicher Teil seiner internen Inhalte erhalten wird. Die Entwässerung von Liposomen erfordert im Allgemeinen die Verwendung eines hydrophilen Trocknungsschuttmittels, wie z. B. ein Disaccharid-Zucker, sowohl an der inneren als auch der äußeren Oberfläche der Doppelschichten des Liposoms (siehe US 4,880,635). Es wird im Allgemeinen angenommen, dass diese hydrophile Verbindung die Neuordnung der Lipide im Liposom verhindert, so dass die Größe und Inhalte während des Trocknungsvorgangs und der nachfolgenden Wiederbefeuchtung erhalten werden. Geeignete Qualitäten für solche Trocknungsschuttmittel sind, dass sie starke Wasserstoffbindungsakzeptoren sind und stereochemische Eigenschaften besitzen, welche die intramolekulare Beabstandung der Komponenten der Doppelschicht des Liposoms bewahren. Alternativ kann das Trocknungsschuttmittel weggelassen werden, wenn die Liposomen-Zubereitung vor der Entwässerung nicht eingefroren wird und nach der Entwässerung ausreichend Wasser in der Zubereitung verbleibt.

#### Lipid-Derivat-Liposomen als Arzneimittel- oder Markierungsträgersysteme

**[0129]** Wie vorstehend erwähnt, können die die Lipid-Derivate einschließenden Liposomen auch zweite Stoffe einschließen, wobei solche zweiten Stoffe Arzneimittel oder Markierungen sein können. Bei einer besonderen Ausführungsform liegt das vorstehend beschriebene auf Lipiden basierende Abgabesystem in Form von Liposomen vor, wobei ein zweiter Stoff inkorporiert ist. Es sollte klar sein, dass zweite Arzneimittel pharmazeutisch wirksame Inhaltsstoffe umfassen können, die eine individuelle oder synergistische pharmazeutische Wirkung in Kombination mit dem Lipid-Derivat und den Lysolipid-Derivaten aufweisen können. Ferner, dass, wenn der zweite Stoff eine Markierung ist, die Markierung Kontraststoffe oder andere Stoffe umfassen kann, die mittels MR, CT, Gamma-Szintigraphie oder Ultraschall nachweisbar sind. Der Begriff "zweite(r)" impliziert nicht unbedingt, dass die pharmazeutische Wirkung des zweiten Arzneimittels geringer ist als z. B. die des aus dem Prodrug abgeleiteten Arzneimittel-Wirkstoffs, sondern wird lediglich verwendet, um zwischen den zwei Stoffgruppen zu unterscheiden.

**[0130]** Ausgehend von dem Gesagten stellt die vorliegende Erfindung auch die Verwendung eines Abgabesystems bereit, das in Form von Liposomen vorliegt und wobei ein zweiter Stoff inkorporiert ist, entweder als Arzneimittel oder als Markierung.

**[0131]** Ein mögliches "zweites Arzneimittel" ist eine beliebige Verbindung oder Stoffzusammensetzung, die Säugetieren, vorzugsweise Menschen, verabreicht werden kann. Solche Agenzien können in Säugetieren eine

biologische Aktivität aufweisen. Zweite Arzneimittel, die mit Liposomen zusammengebracht werden können, sind gut bekannte Antiparasitika, wie z. B. Allopurinol, Amodiaquin, Amphotericin, Antifolate, Artemether + Benflumetol, Artemisinin, Derivate, Chlorproguanil, Chloroquin, die Kombination von Atovaquon und Proguanil HCL (Handelsname Malarone™), Dapson, Doxycyclin, Halofantrin, Interferon-Gamma, Licochalcon A, Mefloquin, Megluminantimonat, Metronidazol, Nitrofurantoin-Derivate, Paromomycin, Pentamidin, Primaquin, Proguanil (Chloroquin plus Proguanil), Puromycin, Pyrimethamin, Pyronaridin, Chinin und Natriumstibogluconat.

**[0132]** Formulierungen mit einem zweiten Arzneimittel in Liposomen erhöhen den therapeutischen Index der zweiten Arzneimittel durch Verminderung der Toxizität des Arzneimittels. Liposomen können auch die Geschwindigkeit vermindern, mit der ein zweites Arzneimittel aus dem Gefäßkreislauf von Säugetieren entfernt wird. Demgemäß kann die Formulierung zweiter Arzneimittel in Liposomen bedeuten, dass weniger Arzneimittel verabreicht werden muss, um die gewünschte Wirkung zu erreichen.

**[0133]** Liposomen können mit einem oder mehreren zweiten Stoff(en) beladen werden, indem das Arzneimittel oder die Markierung in der Lipid- oder wässrigen Phase, die zur Herstellung der Liposomen verwendet wird, löslich gemacht wird. Alternativ können ionisierbare zweite Stoffe in Liposomen geladen werden, indem zuerst die Liposomen ausgebildet werden, durch die äußerste Liposomen-Doppelschicht hindurch ein elektrochemisches Potenzial ausgebildet wird, z. B. mittels eines pH-Gefälles, und dann der ionisierbare zweite Stoff dem wässrigen Medium außerhalb des Liposoms zugegeben wird (siehe z. B. US 5,077,056 und WO 86/01102).

**[0134]** Verfahren zur Herstellung lipophiler Arzneimittel- oder Markierungsderivate, die für die Formulierung von Liposomen oder Mizellen geeignet sind, sind auf dem Fachgebiet bekannt (siehe z. B. US 5,534,499 und US 6,118,011, welche die kovalente Befestigung therapeutischer Agenzien an einer Fettsäurekette eines Phospholipids beschreiben). Eine Mizellen-Formulierung von Taxol ist beschrieben in Alkan-Onkyukel et al., *Pharmaceutical Research*, 11: 206 (1994).

**[0135]** Demgemäß kann das zweite Arzneimittel ein beliebiges aus einer breiten Vielzahl bekannter und möglicher pharmazeutisch wirksamer Inhaltsstoffe sein, ist jedoch vorzugsweise ein therapeutischer und/oder prophylaktischer Wirkstoff. Aufgrund des am Abbau der Liposomen beteiligten Mechanismus ist bevorzugt, dass das zweite Arzneimittel eines ist, das Erkrankungen und/oder Zuständen betrifft, die mit einer örtlich begrenzten Erhöhung der Aktivität extrazellulärer PLA<sub>2</sub> verbunden sind.

**[0136]** Es ist vorgesehen, dass die zweiten Stoffe in den Liposomen gemäß ihrer Hydrophilie verteilt werden, d. h. hydrophile zweite Stoffe sind tendenziell im Hohlraum der Liposomen vorhanden, und hydrophobe zweite Stoffe sind tendenziell in der hydrophoben Doppelschicht vorhanden. Verfahren zur Inkorporierung zweiter Stoffe sind auf dem Fachgebiet bekannt, wie vorstehend erläutert.

**[0137]** Aus dem Vorstehenden sollte klar sein, dass die Lipid-Derivate – als Prodrugs oder diskrete Bestandteile – eine pharmazeutische oder diagnostische Aktivität aufweisen. Bei einer besonderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ferner ein auf Lipiden basierendes Arzneimittel- oder Markierungsabgabesystem zur Verabreichung eines zweiten Stoffs, wobei der zweite Stoff in das System inkorporiert ist (z. B. wobei der zweite Stoff im Inneren des Liposoms oder im Membran-Teil des Liposoms oder im Kernbereich der Mizelle eingekapselt ist), wobei das System Lipid-Derivate einschließt, die aufweisen: (a) eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen und ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen und (b) einen hydrophilen Rest, wobei das Lipid-Derivat ferner ein Substrat für extrazelluläre Phospholipase A2 ist, in dem Maße, dass das organische Radikal hydrolytisch abgespalten werden kann, wohingegen die aliphatische Gruppe im Wesentlichen unangegriffen bleibt, so dass sich ein organisches Säure-Fragment oder ein organisches Alkohol-Fragment und ein Lysolipid-Fragment ergeben, wobei das Lysolipid-Fragment kein Substrat für Lysophospholipase ist.

**[0138]** Wie vorstehend für das System gemäß der anderen Ausführungsform kann das organische Radikal, das hydrolytisch abgespalten werden kann, ein Arzneihilfs- oder Markierungsstoff oder ein Wirksamkeitsmodifikator für den zweiten Stoff sein. Es sollte verstanden werden, dass das Lipid-Derivat ein Lipid-Derivat wie vorstehend definiert ist. Typischerweise macht das Lipid-Derivat 15–100 Mol-%, wie z. B. 50–100 Mol-%, des gesamten entwässerten (Liposomen) Systems aus.

**[0139]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines beliebigen der hierin beschriebenen Arzneimittelabgabesysteme zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung parasitärer Infektionen eines Säugetiers, wobei die parasitäre Infektion durch eine Erhöhung des PLA<sub>2</sub>-Spiegels im Säugetier, insbesondere im konkret infizierten Gewebe, vorzugsweise der Leber oder der Milz, gekennzeichnet ist.

**[0140]** Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines beliebigen der hierin beschriebenen Arzneimittelabgabesysteme zur Herstellung eines Diagnostikums zum Nachweis oder zur Quantifizierung parasitärer Infektionen eines Säugetiers, wobei die parasitäre Infektion durch eine Erhöhung des PLA<sub>2</sub>-Spiegels im Säugetier, insbesondere im konkret infizierten Gewebe, vorzugsweise der Leber oder der Milz, gekennzeichnet ist.

#### Pharmazeutische Zubereitungen und therapeutische Verwendungen

**[0141]** "Pharmazeutisch akzeptable Träger", wie hierin verwendet, sind solche Medien, die im Allgemeinen für die Verwendung im Zusammenhang mit der Verabreichung von Lipiden und Liposomen, einschließlich liposomaler Arzneimittelformulierungen, an Säugetiere, einschließlich Menschen, akzeptabel sind. Pharmazeutisch akzeptable Träger sind im Allgemeinen gemäß einer Anzahl von Faktoren formuliert, die der Fachmann gut bestimmen und verantworten kann, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf folgende: der konkret verwendete Arzneimittel-Wirkstoff und/oder zweite Arznei- oder Markierungsstoff, die Liposomen-Zubereitung, ihre Konzentration, Stabilität und beabsichtigte Bioverfügbarkeit, die Erkrankung, Störung oder der Zustand, der mit der liposomalen Zusammensetzung behandelt wird, die Person, ihr Alter, ihre Größe und ihr Allgemeinzustand sowie der beabsichtigte Verabreichungsweg der Zusammensetzung, z. B. nasal, oral, ophtalmisch, subkutan, intramammär, intraperitoneal, intravenös oder intramuskulär. Typische pharmazeutisch akzeptable Träger, die bei der parenteralen Verabreichung von Arzneimitteln verwendet werden, schließen z. B. ein: D5W, eine wässrige Lösung mit einem Gehalt von 5 Vol.-% Dextrose, und physiologische Kochsalzlösung. Pharmazeutisch akzeptable Träger können zusätzliche Inhaltsstoffe enthalten, z. B. solche, die die Stabilität der eingeschlossenen wirksamen Inhaltsstoffe erhöhen, wie z. B. Konservierungsmittel und Antioxidanzien.

**[0142]** Das Liposom oder Lipid-Derivat ist typischerweise in einem Dispersionsmedium formuliert, z. B. einem pharmazeutisch akzeptablen wässrigen Medium.

**[0143]** Eine Menge der Zusammensetzung, die eine antiparasitär wirksame Menge des Lipid-Derivats umfasst, typischerweise von ca. 0,1 bis ca. 1.000 mg des Lipid-Derivats pro kg des Körpers des Säugetiers, wird vorzugsweise intravenös verabreicht. Für die Zwecke dieser Erfindung sind "antiparasitär wirksame Mengen" liposomaler Lipid-Derivate Mengen, die wirksam sind, um die Einnistung, Vermehrung, das Wachstum etc. von Parasiten in Säugetieren, denen die Lipid-Derivate verabreicht wurden, zu hemmen, verbessern, vermindern oder verhindern. Antiparasitär wirksame Mengen werden im Allgemeinen im Einklang mit einer Anzahl von Faktoren ausgewählt, z. B. dem Alter, der Größe und dem Allgemeinzustand der Person, der behandelten parasitären Infektion und dem beabsichtigten Verabreichungsweg, und mit einer Vielzahl von Mitteln bestimmt, z. B. Dosisbereichstests, die dem Fachmann wohl bekannt sind und die er ausgehend von den Lehren der Erfindung problemlos praktizieren kann. Antiparasitär wirksame Mengen der erfindungsgemäßen liposomalen Arzneimittel/Prodrugs sind in etwa dieselben wie solche Mengen freier, nicht-liposomaler Arzneimittel/Prodrugs, z. B. von ca. 0,1 mg des Lipid-Derivats pro kg Körpergewicht des behandelten Säugetiers bis ca. 1.000 mg pro kg.

**[0144]** Die pharmazeutische Zusammensetzung wird vorzugsweise parenteral durch Injektion, Infusion oder Implantation (intravenös, intramuskulär, intraartikulär, subkutan oder dergleichen) in Dosierungsformen, Formulierungen oder z. B. geeigneten Abgabevorrichtungen oder Implantaten, die herkömmliche, nicht-toxische pharmazeutisch akzeptable Träger und Hilfsstoffe enthalten, verabreicht.

**[0145]** Die Formulierung und Herstellung solcher Zusammensetzungen ist dem Fachmann auf dem Gebiet der pharmazeutischen Formulierung wohl bekannt. Konkrete Formulierungen sind im Lehrbuch mit dem Titel "Remington's Pharmaceutical Sciences" zu finden.

**[0146]** Somit können die pharmazeutischen Zusammensetzungen die Wirkstoffe in Form einer sterilen Injektion umfassen. Um eine solche Zusammensetzung herzustellen, werden die geeigneten Wirkstoffe in einem parenteral akzeptablen flüssigen Vehikel dispergiert, das günstigerweise Suspendiermittel, Lösungsvermittler, Stabilisierungsmittel, pH-Wert-Einstellmittel und/oder Dispergiermittel umfassen kann. Zu akzeptablen Vehikeln, die verwendet werden können, zählen Wasser, Wasser, das durch die Zugabe einer geeigneten Menge Salzsäure, Natriumhydroxid oder eines geeigneten Puffers auf einen geeigneten pH-Wert eingestellt wurde, 1,3-Butandiol, Ringer-Lösung und isotonische Natriumchlorid-Lösung.

**[0147]** Die wässrige Formulierung kann auch ein oder mehrere Konservierungsmittel enthalten, z. B. Methyl, Ethyl oder n-Propyl-p-hydroxybenzoat.

## Toxizität

**[0148]** Die Toxizität der die Lipid-Derivate umfassenden Liposomen kann beurteilt werden, indem das therapeutische Fenster "TW" bestimmt wird, d. h. ein Zahlenwert, der aus dem Verhältnis zwischen der durch die Verbindung ausgelösten Hämolyse und ihrer Fähigkeit, das Wachstum/die Vermehrung von Parasiten zu hemmen, abgeleitet wird. TW-Werte werden als  $HI_5/GI_{50}$  definiert (wobei " $HI_5$ " gleich der Konzentration der Verbindung ist, welche die Hämolyse von 5% der roten Blutzellen in einer Kultur bewirkt, und wobei " $GI_{50}$ " gleich der Dosis der Verbindung ist, die eine fünfzigprozentige Wachstumshemmung in einer Population parasitärer Zellen, die dem Mittel ausgesetzt ist, bewirkt). Je höher der  $HI_5$ -Wert eines Mittels, desto weniger hämolytisch ist das Mittel; höhere  $HI_5$ -Werte bedeuten, dass größere Konzentrationen der Verbindung vorhanden sein müssen, damit die Verbindung eine Hämolyse von 5% auslöst. Folglich ist eine Verbindung therapeutisch umso günstiger, je höher ihr  $HI_5$ -Wert, weil mehr davon gegeben werden kann, bevor sie die gleiche Menge an Hämolyse bewirkt wie ein Mittel mit einem niedrigeren  $HI_5$ -Wert. Im Gegensatz dazu zeigen niedrigere  $GI_{50}$ -Werte bessere Therapeutika an; ein niedrigerer  $GI_{50}$ -Wert zeigt an, dass eine geringere Konzentration eines Mittels für die 50-%ige Wachstumshemmung erforderlich ist. Demgemäß sind die therapeutischen Eigenschaften einer Verbindung/eines Mittels umso besser, je höher ihr/sein  $HI_5$ -Wert und je niedriger ihr/sein  $GI_{50}$ -Wert.

**[0149]** Wenn das TW eines Arzneimittels geringer als 1 ist, kann er im Allgemeinen nicht wirksam als Therapeutikum verwendet werden. Das heißt, der  $HI_5$ -Wert des Mittels ist ausreichend niedrig, und sein  $GI_{50}$ -Wert ist ausreichend hoch, so dass es im Allgemeinen nicht möglich ist, eine ausreichende Menge des Mittels zu verabreichen, um ein ausreichendes Niveau parasitärer Wachstumshemmung zu erreichen, ohne auch die Hämolyse auf ein inakzeptables Niveau zu erhöhen. Da die Lipid-Derivat-Liposomen die niedrigere Aktivität extrazellulärer  $PLA_2$  im Blutstrom, verglichen mit der Aktivität im erkrankten Gewebe, ausnutzen, wird angenommen, dass das TW viel höher ist als das für normale Monoether-Lysolipide. Da die Varianz der Aktivität in Größenordnungen ist und die Liposomen in Gewebe mit einer hohen Aktivität extrazellulärer  $PLA_2$  "gefangen" werden, wird im Allgemeinen angenommen, dass das TW der erfindungsgemäßen Liposomen größer als 3, vorzugsweise größer als ca. 5 und noch bevorzugter größer als ca. 8 ist.

**[0150]** Die Erfindung wird durch die folgenden nicht einschränkenden Beispiele veranschaulicht.

## BEISPIELE

## Beispiel 1

## Herstellung der Liposomen

**[0151]** Unilamellare voll hydratisierte Liposomen mit enger Größenverteilung wurden aus 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (1-O-DPPC) und Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC) hergestellt. DPPC wurde von Avanti Polar Lipids bezogen, und 1-O-DPPC wurde in unserem Labor synthetisiert. Kurz gefasst, wurden gewogene Mengen an DPPC oder 1-O-DPPC in Chloroform gelöst. Das Lösungsmittel wurde durch einen sanften  $N_2$ -Strom entfernt, und die Lipid-Filme wurden über Nacht bei geringem Druck getrocknet, um Spuren des Lösungsmittels zu entfernen. Multilamellare Vesikel wurden hergestellt, indem die getrockneten Lipide in einer Pufferlösung, enthaltend 150 mM KCL, 10 mM HEPES (pH = 7,5), 1 mM  $NaN_3$ , 30  $\mu$ M  $CaCl_2$  und 10  $\mu$ M EDTA, dispergiert wurden. Die multilamellaren Vesikel wurden zehn Mal durch zwei gestapelte Polycarbonat-Filter mit 100 nm Porengröße extrudiert, wie von Mayer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 858, 161–168, beschrieben.

**[0152]** Wärmekapazitätskurven wurden mittels eines N-DSC II Differenzialscanningkalorimeters (Calorimetry Sciences Corp., Provo) vom leistungskompensierenden Typ mit einem Zellvolumen von 0,34 ml erhalten. Vor dem Scannen wurde die Liposomen-Suspension 50 min im Kalorimeter bei der Anfangstemperatur ins Gleichgewicht gebracht. Die Scanninggeschwindigkeit betrug  $+10^\circ C/h$ . Die Lipid-Konzentration betrug 1 mM. Der Gel-Fluid-Übergang der multilamellaren Liposomen (MLV) ist als ein scharfer Übergang erster Ordnung gekennzeichnet, wie durch die schmale Spitze in den in **Fig. 1a** und **1b** gezeigten Wärmekapazitätskurven (obere Kurven) für 1-O-DPPC und DPPC widergespiegelt. Die scharfe Spitze spiegelt das Übergangsverhalten multilamellarer Liposomen wieder und steht im Gegensatz zum breiteren Gel-Fluid-Übergang, der für unilamellare Liposomen (LUV) beobachtet wurde (Pedersen et al., 1996, *Biophys. J.* 71, 554–560), wie in **Fig. 1a** und **1b** (untere Kurven) für die unilamellaren extrudierten 1-O-DPPC- und DPPC-Liposomen gezeigt.

## Beispiel 2

Reaktionsprofil und Verzögerungszeitmessungen für Phospholipase A<sub>2</sub>

**[0153]** Phospholipase A<sub>2</sub> aus gereinigtem Schlangengift (PLA<sub>2</sub> von *Agkistrodon piscivorus piscivorus*) wurde gemäß dem Verfahren von Maraganore et al., *J. Biol. Chem.* 259, 13839–13843 isoliert. Dieses PLA<sub>2</sub>-Enzym gehört zur Klasse der 14 kD Sekretenzyme mit niedrigem Molekulargewicht, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit menschlicher extrazellulärer Phospholipase A<sub>2</sub> aufweisen, was gemeinsame molekulare Mechanismen der durch die Phospholipase katalysierten Hydrolyse an der Lipid-Membran-Schnittstelle anzeigt (Wery et al., *Nature* 352, 79–82; Hønger et al. *Biochemistry* 35, 9003–9006; Vermehren et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1373, 27–36). Unilamellare voll hydratisierte Liposomen mit enger Größenverteilung wurden aus 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (1-O-DPPC) und aus 1-O-DPPC mit 5 Mol-% 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-350] (1-O-DPPE-PEG350) hergestellt. Die Versuchsbedingungen für das in [Fig. 2](#) gezeigte PLA<sub>2</sub>-Reaktionszeitprofil und die in Tabelle 1 ausgewiesene Verzögerungszeit und prozentuale Hydrolyse waren: 0,15 mM unilamellare Liposomen, 150 nM PLA<sub>2</sub>, 150 mM KCL, 10 mM HEPES (pH 7,5), 1 mM NaN<sub>3</sub>, 30 µM CaCl<sub>2</sub> und 10 µM EDTA.

Zusammensetzung	Verzögerungszeit (s)	1-O-DPPC (%)
100% 1-O-DPPC	583	79
95% 1-O-DPPC/5% 1-O-DPPE-PEG350	128	73

Tabelle 1. Verzögerungszeit und hydrolysiertes 1-O-DPPC in Prozent bei 41 °C, bestimmt mittels HPLC. Die Lipid-Konzentration betrug 0,150 mM in einem 10 mM HEPES-Puffer (pH = 7,5).

**[0154]** Die katalytische Reaktion wurde ausgelöst durch die Zugabe von 8,9 µL einer 42 µM PLA<sub>2</sub>- (150 nM) Vorratslösung zu 2,5 ml der thermostatierten Liposomen-Suspension (0,150 mM), die vor der Zugabe von PLA<sub>2</sub> 800 sek ins Gleichgewicht gebracht wurde. Das charakteristische von PLA<sub>2</sub> gegenüber den Liposomen wird durch eine plötzliche Zunahme der Eigenfluoreszenz von PLA<sub>2</sub> bei 340 nm nach Anregung bei 285 nm, gefolgt von einer damit einhergehenden Abnahme der Lichtstreuung bei 90° von der Lipid-Suspension, signalisiert (Hønger et al., *Biochemistry* 35, 9003–9006). Proben für die HPLC-Analyse der Menge an verbleibendem, nicht hydrolysiertem 1-O-DPPC und folglich der Menge an erzeugtem 1-O-Hexadecyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin (Lyso-1-O-DPPC) wurden vor der Zugabe von PLA<sub>2</sub> und 1200 sek nach der beobachteten Verzögerungszeit genommen. 100 µl aliquote Teile wurden aus der Lipid-Suspension entnommen und rasch mit 1 ml Chloroform/Methanol/Essigsäure-(2:4:1) Lösung gemischt, um die enzymatische Reaktion zu löschen. Die Lösung wurde mit 1 ml Wasser gewaschen, und 20 µl der schweren organischen Phase wurden für die HPLC verwendet. Die HPLC-Chromatogramme in [Fig. 3](#) zeigen die Mengen an 1-O-DPPC vor und nach (t = 3000 sek) der Zugabe von PLA<sub>2</sub> (t = 800 sek) zu der Liposomen-Suspension. Die HPLC-Analyse erfolgte mittels einer 5 µm Diolsäule, einer mobilen Phase, zusammengesetzt aus Chloroform/Methanol/Wasser (730:230:30, v/v), und eines Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektors. Der Stoffumsatz der durch PLA<sub>2</sub> katalysierten Lipid-Hydrolyse von 1-O-DPPC zu Lyso-1-O-DPPC wurde mittels HPLC gemessen (siehe Tabelle 1). Die Eigenfluoreszenz des Enzyms und die Lichtstreuung bei 90° wurden bezogen auf die Zeit gemessen, wie in [Fig. 2](#) gezeigt.

## Beispiel 3

Durch Phospholipase A<sub>2</sub> ausgelöste Freisetzung eines eingekapselten wasserlöslichen Modellarzneimittels

**[0155]** Multilamellare 1-O-DPPC-Liposomen wurden in Gegenwart von fluoreszierendem Calcein in einer selbstlöschenden Konzentration von 20 mM hergestellt, indem ein Film aus 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin in einer HEPES-Pufferlösung bei pH = 7,5 eine Stunde bei 10 °C über der Phasenübergangstemperatur hydratisiert wurde. Unilamellare Liposomen wurden ausgebildet, indem die multilamellaren Liposomen zehn Mal durch zwei gestapelte 100 nm Polycarbonat-Filter extrudiert wurden. Die unilamellaren Liposomen wurden rasch auf eine Temperatur unterhalb der Übergangstemperatur abgekühlt, und die Calcein enthaltenden 1-O-DPPC-Liposomen wurden mittels einer mit Sephadex G-50 gepackten Chromatographiesäule von freiem Calcein getrennt.

**[0156]** Die Versuchsbedingungen für die durch PLA<sub>2</sub> ausgelöste Calceinfreisetzung waren: 25 µM unilamellare 1-O-DPPC-Liposomen, 25 nM PLA<sub>2</sub>, 150 mM KCL, 10 mM HEPES (pH 7,5 oder 8,0), 1 mM NaN<sub>3</sub>, 30 µM CaCl<sub>2</sub> und 10 µM EDTA. PLA<sub>2</sub> wurde zur Zeit von 900 sek zu 2,5 ml der thermostatierten 1-O-DPPC-Liposo-

men-Suspension gegeben, die vor der Zugabe von PLA<sub>2</sub> mindestens 20 min bei 37°C ins Gleichgewicht gebracht wurde. Der Prozentsatz an freigesetztem Calcein wird bestimmt als: % Freisetzung =  $100 \times (I_{F(t)} - I_B) / (I_T - I_B)$ , wobei  $I_{F(t)}$  die gemessene Fluoreszenz zur Zeit t nach der Zugabe des Enzyms ist,  $I_B$  die Hintergrundfluoreszenz ist und  $I_T$  die Gesamtfluoreszenz ist, gemessen nach der Zugabe von Triton X-100, die zur kompletten Freisetzung von Calcein durch Aufbrechen der 1-O-DPPC-Liposomen führt. PLA<sub>2</sub> löste eine Gesamtfreisetzung von 90 Prozent des in den 1-O-DPPC-Liposomen eingeschlossenen Calceins aus, wie in [Fig. 4](#) gezeigt.

#### Beispiel 4

Durch Phospholipase A gesteuerte Erhöhung der Durchlässigkeit einer Ziel-Modellmembran

**[0157]** Multilamellare Modellmembran-Zielliposomen wurden in Gegenwart von fluoreszierendem Calcein in einer selbstlöschenden Konzentration von 20 mM hergestellt, indem ein Film aus 1,2-O-Dioctadecyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (D-O-SPC) in einer HEPES-Pufferlösung bei pH = 7,5 eine Stunde bei 10°C oberhalb der Phasenübergangstemperatur ( $T_m = 55^\circ\text{C}$ ) hydratisiert wurde. Unilamellare Liposomen wurden ausgebildet, indem die multilamellaren Zielliposomen zehn Mal durch zwei gestapelte 100 nm Polycarbonat-Filter extrudiert wurden. Die unilamellaren Liposomen wurden rasch auf eine Temperatur unterhalb der Übergangstemperatur abgekühlt, und die Calcein enthaltenden Liposomen wurden mittels einer mit Sephadex G-50 gepackten Chromatographiesäule von freiem Calcein getrennt. Die aus 1-O-Hexadecyl-2-hexadecaoyl-sn-glycero-3-phosphocholin zusammengesetzten unilamellaren Trägerliposomen wurden hergestellt wie oben beschrieben. Die Calceinfreisetzung aus den Zielliposomen wird bestimmt, indem die Fluoreszenzintensität bei 520 nm nach Anregung bei 492 nm gemessen wird.

**[0158]** Die Konzentrationen von D-O-SPC- und 1-O-DPPC-Liposomen betragen 25 µM. PLA<sub>2</sub> aus Schlangengift (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) wurde zugegeben (25 nM), um die hydrolytische Reaktion auszulösen, die zur Bildung von 1-O-Hexadecyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin-(Lyso-1-O-DPPC) und Fettsäure-Hydrolyseprodukten führt. Im Zuge der Freisetzung von Calcein aus den D-O-SPC-Liposomen aufgrund der Inkorporierung der keine Doppelschicht ausbildenden Lyso-1-O-PPC- und Fettsäure-Hydrolyseprodukte in die Ziellipidmembran wird eine lineare Zunahme der Fluoreszenz bei 520 nm nach Anregung bei 492 nm beobachtet, wenn Calcein in das umgebende Puffermedium ausgewaschen wird, wie in [Fig. 5](#) gezeigt. Der Prozentsatz an freigesetztem Calcein wird bestimmt wie vorstehend beschrieben (siehe Beispiel 3).

#### Beispiel 5

##### Hämolyseversuch

**[0159]** Unilamellare voll hydratisierte Liposomen mit enger Größenverteilung wurden hergestellt aus 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (1-O-DPPC) und aus 1-O-DPPC mit 5 Mol-% 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-350] (1-O-DPPE-PEG350). Die Lipide wurden in mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) hydratisiert. 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholin (ET-18-OCH<sub>3</sub>) in PBS wurde als Vergleichsprobe in den Versuch einbezogen.

**[0160]** Der Hämolyseversuch erfolgte wie von Perkins et al., *Biochim. et Biophys. Acta* 1327, 61–68, beschrieben. Kurz gefasst, wurde jede Probe nacheinander mit PBS verdünnt, und 0,5 ml jeder verdünnten Suspension von 1-O-DPPC-Liposomen wurden mit 0,5 ml gewaschenen menschlichen roten Blutzellen (RBC) gemischt [4% in PBS (v/v)]. Für Kontrollen wurden 0,5 ml der Suspension roter Blutzellen entweder mit 0,5 ml Pufferlösung (negative Hämolysekontrolle) oder 0,5 ml Wasser (positive Hämolysekontrolle) gemischt. Proben und Standard wurden bei 37°C in einem Inkubator platziert und 20 Stunden bewegt. Die Röhrchen wurden mit niedriger Geschwindigkeit (2000 × G) 10 Minuten zentrifugiert, um RBC-Pellets auszubilden. 200 µl des Überstands wurden anhand der Absorbanz bei 550 nm mittels eines Perkin-Elmer 320 Scanningspektrophotometers quantifiziert. 100 Prozent Hämolyse wurde als maximale Hämolyse, erhalten durch das Detergens Triton X-100, definiert. Das Hämolyseprofil in [Fig. 6](#) zeigt einen niedrigen Hämolysewert (unter 5 Prozent) für 2 mM 1-O-DPPC-Liposomen. [Fig. 6](#) zeigt auch, dass niedrige Konzentrationen von ET-18-OCH<sub>3</sub> einen wesentlichen Hämolysegrad auslösen.

## Beispiel 6

Steigerung der Aktivität von Phospholipase A<sub>2</sub> durch negativ geladene, mit Polymer gefropfte 1-O-Lipide

**[0161]** Unilamellare voll hydratisierte Liposomen mit enger Größenverteilung wurden aus 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (1-O-DPPC) und 1-O-DPPC mit 5 Mol-% 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-350] (1-O-DPPE-PEG350) hergestellt, wie in Beispiel 2 beschrieben. Die Versuchsbedingungen für die Messungen der PLA<sub>2</sub>-Verzögerungszeit waren: 0,15 mM unilamellare Liposomen, 150 nM PLA<sub>2</sub>, 150 mM KCL, 10 mM HEPES (pH 7,5), 1 mM NaN<sub>3</sub>, 30 µM CaCl<sub>2</sub> und 10 µM EDTA. Die katalytische Reaktion wurde ausgelöst durch die Zugabe von 8,9 µL einer 42 µM PLA<sub>2</sub>-Vorratslösung zu 2,5 ml der thermostatierten Liposomen-Suspension, die vor der Zugabe von PLA<sub>2</sub> 800 Sekunden bei 41°C ins Gleichgewicht gebracht wurde. Die vor dem Beginn schneller enzymatischer Aktivität verstrichene Zeit wird anhand einer plötzlichen Zunahme der Eigenfluoreszenz von PLA<sub>2</sub> bei 340 nm nach Anregung bei 285 nm bestimmt. Die in [Fig. 7](#) gezeigten Ergebnisse zeigen eine wesentliche Abnahme der Verzögerungszeit, wenn 5 Mol-% des negativ geladenen 1-O-DPPE-PEG<sub>350</sub> in die 1-O-DPPC-Liposomen inkorporiert werden.

## Beispiel 7

Herstellung von aus 1-O-DPPE-PEG350, DSPE-PEG750/DPPE-PEG750 zusammengesetzten Mizellen

**[0162]** Mizellen wurden aus 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-350] (1-O-DPPE-PEG350), Dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-750] (DSPE-PEG750) hergestellt. Kurz gefasst, wurden gewogene Mengen des Polymer-Lipids in Chloroform gelöst. Das Lösungsmittel wurde durch einen sanften N<sub>2</sub>-Strom entfernt. Die Lipid-Filme wurden dann über Nacht bei geringem Druck getrocknet, um Spuren des Lösungsmittels zu entfernen. Mizellen wurden hergestellt, indem die getrockneten Polymer-Lipide in einer Pufferlösung, enthaltend 150 mM KCL, 10 mM HEPES (pH = 7,5), 1 mM NaN<sub>3</sub>, 30 µM CaCl<sub>2</sub> und 10 µM EDTA, dispergiert wurden.

## Beispiel 8

Erhöhung der Durchlässigkeit einer Ziel-Modellmembran, gesteuert durch die Hydrolyse von Mizellen durch Phospholipase A<sub>2</sub>

**[0163]** Multilamellare Modellmembran-Zielliposomen wurden in Gegenwart von fluoreszierendem Calcein in einer selbstlöschenden Konzentration von 20 mM hergestellt, indem ein Film aus 1,2-O-Dioctadecyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholinen (D-O-SPC) in einer HEPES-Pufferlösung bei pH = 7,5 eine Stunde bei 10°C über der Phasenübergangstemperatur ( $T_m = 55^\circ\text{C}$ ) hydratisiert wurde. Unilamellare Liposomen wurden hergestellt, indem die multilamellaren Liposomen zehn Mal durch zwei gestapelte 100 nm Polycarbonat-Filter extrudiert wurden. Die unilamellaren Liposomen wurden rasch auf eine Temperatur unterhalb der Übergangstemperatur abgekühlt, und die Calcein enthaltenden Liposomen wurden mittels einer mit Sephadex G-50 gepackten Chromatographiesäule von freiem Calcein getrennt. Aus 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-350] (1-O-DPPE-PEG350), Dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-750] (DSPE-PEG750) zusammengesetzte Mizellen wurden hergestellt wie in Beispiel 7 beschrieben. Die Calceinfreisetzung aus dem Zielliposom wird durch Messen der Fluoreszenzintensität bei 520 nm nach Anregung bei 492 nm bestimmt.

**[0164]** Die Konzentrationen von D-O-SPC- und Polymer-Lipid-Mizellen betragen 25 µM. PLA<sub>2</sub> aus Schlangengift (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) wurde zugegeben (25 nM), um die hydrolytische Reaktion auszulösen, die zur sofortigen Bildung der Lysolipid- und Fettsäure-Hydrolyseprodukte führt. Im Zuge der Freisetzung von Calcein aus den D-O-SPC-Liposomen aufgrund der Inkorporierung des keine Doppelschicht ausbildenden Polymer-Lyso-1-O-Lipids und der Fettsäure in die Ziel-Lipidmembran wird eine lineare Zunahme der Fluoreszenz bei 520 nm nach Anregung bei 492 nm beobachtet, wenn Calcein in das umgebende Puffermedium ausgewaschen wird, wie in [Fig. 8](#) gezeigt. Der Prozentsatz an freigesetztem Calcein wird bestimmt wie in Beispiel 3 beschrieben. Die durch PLA<sub>2</sub> katalysierte Hydrolyse von 1-O-DPPE-PEG350 löste die schnellste Freisetzungsgeschwindigkeit aus.

## Beispiel 9

## Hydrolyse von aus DSPE-PEG750 zusammengesetzten Mizellen

**[0165]** Der Hydrolyse von aus DSPE-PEG750 zusammengesetzten Mizellen folgte die Analyse der Menge an erzeugter Stearinsäure. Die katalytische Reaktion wurde ausgelöst durch die Zugabe von 8,9  $\mu\text{L}$  einer 42  $\mu\text{M}$   $\text{PLA}_2$ - (150 nM) Vorratslösung zu 2,5 ml einer thermostatierten Lipid-Suspension von DSPE-PEG750 (0,150 mM), die vor der Zugabe von  $\text{PLA}_2$  600 Sekunden bei 45°C ins Gleichgewicht gebracht wurde. Das charakteristische Ausbruchsverhalten von  $\text{PLA}_2$  gegenüber den Mizellen wird durch eine plötzliche Zunahme der Eigenfluoreszenz von  $\text{PLA}_2$  bei 340 nm nach Anregung bei 285 nm, gefolgt von einer damit einhergehenden Abnahme der Lichtstreuung bei 90° von der Lipid-Suspension, signalisiert (Hønger et al., Biochemistry 35, 9003–9006). Proben für die HPLC-Analyse der Menge an erzeugter Stearinsäure wurden vor der Zugabe von  $\text{PLA}_2$  und 100 sek nach der beobachteten Verzögerungszeit genommen. Die HPLC-Chromatogramme in [Fig. 9](#) zeigen die Menge an erzeugter Stearinsäure 100 sek nach der beobachteten Verzögerungszeit (10 sek) bei 45°C. Die Menge (0,156 mM) an durch Hydrolyse erzeugter Stearinsäure war gleich der 100-%igen Hydrolyse der DSPE-PEG750-Polymer-Lipide. Die HPLC-Analyse erfolgte mittels einer 5  $\mu\text{m}$  Diolsäule, einer mobilen Phase, zusammengesetzt aus Chloroform/Methanol/Wasser (730:230:30, v/v) und eines Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektors (siehe Beispiel 2).

## Beispiel 10

## Modellbeispiele

**[0166]** Aus neutralen und/oder negativ geladenen Phospholipiden zusammengesetzte Liposomen können als vielseitige Arzneimittel- oder Markierungsabgabesysteme wirken, die parasitäre Erkrankungen in Geweben mit aufgrund der parasitären Infektion erhöhten  $\text{PLA}_2$ -Spiegeln anvisieren; Organe von besonderem Interesse sind die Leber, die Milz und das Knochenmark. Bei intravenöser Verabreichung tendieren diese Liposomen stark dazu, sich in der Leber und der Milz zu akkumulieren, aufgrund einer Kombination physikochemischer Faktoren, welche die Lipid-Zusammensetzung der Liposomen betreffen, und physiologischer Faktoren, darunter der guten Durchblutung und des zahlreichen Vorkommens von Makrophagen in der Leber und der Milz. In den Beispielen hierin wird ein experimentelles Modellsystem beschrieben, das ein neues Prinzip zur verbesserten Arzneimittel- oder Markierungsabgabe illustriert, das eine gesteigerte Aktivität extrazellulärer Phospholipase  $A_2$  im infizierten Leber- oder Milzgewebe ausnutzt. Die Phospholipase  $A_2$  hydrolysiert einen auf Lipiden basierenden Pro-Verstärker im Trägerliposom, wobei Lysophospholipid und freie Fettsäure produziert werden, die nachweislich synergistisch zu einer gesteigerten Destabilisierung der Liposomen und Arzneimittelfreisetzung führen, während gleichzeitig die Durchlässigkeit der Zielmembran erhöht wird. Das vorgeschlagene System kann hitzeempfindlich gemacht werden und bietet einen vernünftigen Weg zur Entwicklung durchdachter auf Liposomen basierender Abgabesysteme, indem in den Träger spezifische auf Lipiden basierende Pro-Verstärker, Pro-Destabilisatoren oder Prodrugs inkorporiert werden, die nur an den erkrankten und infizierten Zielorten durch Phospholipase  $A_2$  automatisch aktiviert werden.

**[0167]** Liposomen sind sich selbst organisierende Lipidsysteme, und ihre Stabilität wird daher in großem Maße durch nicht spezifische physikalische Wechselwirkungen gesteuert. Kenntnisse über die molekulare Steuerung der physikalischen Eigenschaften von Liposomen sind daher wichtig, um die Eigenschaften der Liposomen in Bezug auf spezifische Arzneimittelabgabezwecke zu beeinflussen und maßzuschneidern. Als ein Beispiel wurde der thermisch ausgelöste Gel-Fluid-Lipidphasenübergang ausgenutzt und optimiert, um Systeme zur gesteigerten Freisetzung von Arzneimitteln aufgrund von Hyperthermie zu konzipieren. Es wäre wünschenswert, ein intelligentes und vielseitiges Arzneimittelabgabesystem zu konzipieren, in das ein dualer virtueller Auslösemechanismus wie folgt eingebaut ist: gleichzeitig (i) gesteigerte Arzneimittelfreisetzung selektiv im infizierten Zielgewebe und (ii) gesteigerter Transport des Arzneimittels oder der Markierung in die infizierten Zellen. Dieses Prinzip ist in [Fig. 10](#) schematisch illustriert.

**[0168]** Durch die Beispiele hierin wird die Entwicklung eines einfachen und wirksamen experimentellen biophysikalischen Modellsystems beschrieben, das einen solchen dualen Mechanismus stützt, der an den infizierten Zielorten, wie z. B. der Leber und der Milz, ausgelöst werden soll. Das Modell nimmt eine erhöhte Aktivität extrazellulärer Phospholipase  $A_2$  im infizierten Gewebe an, wie es in entzündetem und kanzerösem Gewebe der Fall ist, in dem der Spiegel extrazellulärer  $\text{PLA}_2$  um ein Vielfaches vergrößert sein kann. Bei der Einwirkung extrazellulärer  $\text{PLA}_2$  werden die Phospholipide negativ geladener Liposomen, wie gezeigt, einer gesteigerten Hydrolyse unterzogen, verglichen mit neutralen Liposomen. Dies führt zur Destabilisierung des Liposoms und einer gesteigerten Freisetzung des eingekapselten Arzneimittels oder der eingekapselten Markierung. Die Hy-



drolyseprodukte, Lysophospholipide und freie Fettsäuren, wirken wiederum als Absorptionsverstärker für das Eindringen des Arzneimittels oder der Markierung durch die Zielmembran hindurch. Auf diese Weise verhalten sich die Phospholipide des Trägerliposoms als Pro-Destabilisatoren am Ort des Trägers und als Pro-Verstärker am Ort der Zielmembran. Die molekularen Details dieses Prinzips sind in [Fig. 11](#) schematisch illustriert.

**[0169]** Das experimentelle Modellsystem besteht aus einem negativ geladenen Liposomenträger und einer Modell-Zielmembran. Der Träger ist ein 100 nm unilamellares Liposom, hergestellt aus Dipalmitoylphosphatidylcholin-Lipiden (DPPC) mit einer kleinen Menge (2,5 Mol-%) negativ geladenem Lipid vom Typ Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE)-PEG<sub>2000</sub>. Die Zielmembran ist ein anderes Liposom, hergestellt aus 1,2-O-Dioctadecyl-sn-glycero-phosphatidylcholin (D-O-SPC), das ein Phospholipid ist, bei dem die Acyl-Bindungen der Stearoyl-Ketten Ether-Bindungen sind. Im Gegensatz zu DPPC ist D-O-SPC inert gegenüber der durch PLA<sub>2</sub> katalysierten Hydrolyse und ahmt dadurch die Stabilität einer intakten Ziel-Zellmembran gegenüber einem Abbau durch ihre eigenen Enzyme nach. Dieser experimentelle Versuch, der sowohl die gleichzeitige als auch die separate Untersuchung der Wirkung von Destabilisatoren an den Trägerliposomen und der Wirkung von Verstärkern an der Zielmembran ermöglicht, beinhaltet den Einschluss eines wasserlöslichen fluoreszierenden Calcein-Modellarzneimittels in einer selbstlöschenden Konzentration im Inneren des nicht hydrolysierbaren Zielliposoms statt im Trägerliposom. Der erhöhte Spiegel extrazellulärer PLA<sub>2</sub> an der Zielmembran kann dann simuliert werden, indem extrazelluläre PLA<sub>2</sub> zugegeben wird, um die hydrolytische Reaktion in einer Suspension der Träger- und Zielliposomen auszulösen. Das Eindringen des Calceins durch die D-O-SPC-Zielmembran hindurch wird nachfolgend anhand der Zunahme der Fluoreszenz überwacht. Um die Wirkung des Vorhandenseins kleiner Mengen negativ geladener PEG-Lipide im Trägerliposom zu untersuchen, wurde ein ähnliches Experiment mit herkömmlichen reinen DPPC-Liposomen durchgeführt. Um die durchlässigkeitserhöhende Wirkung von Lysophospholipiden mit der freien Fettsäuren zu vergleichen und von dieser zu unterscheiden, wurden ferner Experimente ohne Enzyme durchgeführt, bei denen Lysophospholipide und freie Fettsäuren den Zielliposomen gleichzeitig oder separat zugegeben wurden.

**[0170]** In [Fig. 12a](#) sind die Ergebnisse für die Freisetzung von Calcein bezogen auf die Zeit nach der Zugabe von PLA<sub>2</sub> zu dem System gezeigt. Die Reaktionszeitverlauf der konkreten verwendeten PLA<sub>2</sub> weist ein charakteristisches verzögertes Ausbruchverhalten mit einer so genannten Verzögerungszeit auf, die günstig als ein Maß der enzymatischen Aktivität verwendet werden kann. Eine drastische Abnahme der Verzögerungszeit und eine damit einhergehende Steigerung der Freisetzungsgeschwindigkeit werden beobachtet, wenn die Trägerliposomen das negativ geladene DPPE-PEG<sub>2000</sub> enthalten, gemäß den vorherigen Erkenntnissen des gesteigerten Abbaus negativ geladener mit Polymer beschichteter Liposomen durch extrazelluläre PLA<sub>2</sub>.

**[0171]** Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Produkte der durch PLA<sub>2</sub> katalysierten Hydrolyse der DPPC-Lipide des liposomalen DPPC-Trägers, Lysophospholipid und freie Fettsäure, die in einem 1:1-Gemisch produziert werden, in die Zielmembran inkorporiert werden und zu einer großen Erhöhung der Membrandurchlässigkeit führen. Diese Produkte, die eine sehr geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, bewirken aufgrund ihrer nicht zylindrischen molekularen Formen bekanntermaßen ein Krümmungsspannungsfeld in der Membran oder eine geringe laterale Phasentrennung, die Membrandefekte und eine erhöhte Durchlässigkeit bewirken. Dies wird durch die Daten in [Fig. 13](#) untermauert, die zeigen, dass die separate Zugabe von Lysophospholipid oder Fettsäure zum vorliegenden Zielsystem bei Nichtvorhandensein von PLA<sub>2</sub> zu einer erhöhten Geschwindigkeit der Calceinfreisetzung durch die Zielmembran hindurch führt. Die entscheidende Erkenntnis ist jedoch, dass, wenn Lysophospholipid und freie Fettsäure gleichzeitig in einem 1:1-Gemisch zugegeben werden, eine drastische Steigerung der Freisetzungsgeschwindigkeit beobachtet wird, wie in [Fig. 13](#) gezeigt. Dies legt es sehr nahe, dass die zwei Verstärker synergistisch wirken, und unterstreicht dadurch die einzigartige Möglichkeit bei der Ausnutzung der durch PLA<sub>2</sub> katalysierten Hydrolyse für eine kombinierte Destabilisierung des Trägerliposoms und Steigerung des Arzneimitteltransports durch die Zielmembran hindurch. Die synergistische Wirkung wird ferner durch die Tatsache gesteigert, dass extrazelluläre PLA<sub>2</sub> durch ihre eigenen Hydrolyseprodukte aktiviert wird, was die abbaubaren Phospholipide des Trägerliposoms als eine Art Pro-Aktivatoren enthüllt.

**[0172]** Es sollte darauf hingewiesen werden, dass beim vorliegenden Arzneimittelabgabe-Modellsystem die Wirkung der Verwendung von Lipiden als Pro-Verstärker und ProDestabilisatoren über die Aktivität extrazellulärer PLA<sub>2</sub> dynamisch ist und sich auf eine innewohnende Zeitskala bezieht. Diese Zeitskala ist die wirksame Rückhaltezeit der Trägerliposomen nahe der Zielmembran. Je schneller das Enzym wirksam wird, umso schneller erfolgt die Arzneimittelfreisetzung und umso größer ist die Arzneimittelabsorption während der Zeit, die der Träger nahe dem Ziel verbringt. Je schneller das Enzym arbeitet, umso leichter wird es ferner für die Hydrolyse weiterer Arzneimittel tragender Liposomen verfügbar, die sich dem erkrankten Zielort nähern. Nachdem festgestellt wurde, dass die Aktivität extrazellulärer PLA<sub>2</sub> genutzt werden kann, um die Arzneimittelfreiset-

zung zu steuern, eröffnen sich mehrere vernünftige Wege für intelligente Verbesserungen des vorgeschlagenen Arzneimittelabgabesystems über die Verwendung gut bekannter Mechanismen der Veränderung der Aktivität extrazellulärer PLA<sub>2</sub> durch Beeinflussung der physikalischen Eigenschaften der Lipid-Doppelschicht, gegenüber denen das Enzym bekanntermaßen empfindlich ist. Folglich ist die Strategie, bestimmte physikalische Eigenschaften der Trägerliposomen zu verändern, ohne ihre Zirkulationszeit in den Gefäßen wesentlich zu ändern. Wir illustrieren dieses allgemeine Prinzip durch Aufzeigen der Wirkungen eines physikochemischen Faktors, der Lipid-Zusammensetzung des Trägers, sowie eines (thermodynamischen) Umweltfaktors, der lokalen Temperatur am Zielort.

**[0173]** Kurzkettige Phospholipide, wie z. B. Didecanoylphosphatidylcholin (DCPC), aktivieren extrazelluläre PLA<sub>2</sub>. Die Wirkung auf das Eindringen von Calcein durch die Zielmembranen hindurch, die durch die Inkorporierung einer kleinen Menge DCPC in die PEG-Trägerliposomen ausgelöst wird, ist ebenfalls in [Fig. 12a](#) gezeigt. Die Freisetzung ist aufgrund einer fast sofortigen Aktivierung des Enzyms sehr schnell. Wir haben ferner festgestellt, dass extrazelluläre PLA<sub>2</sub> deaktiviert wird (Daten nicht gezeigt), wenn eine große Menge Cholesterol ( $\approx 20$  Mol-%) in Liposomen inkorporiert wird. Im Gegensatz dazu stellen wir fest, dass eine kleine Menge Cholesterol ( $\approx 3$  Mol-%) extrazelluläre PLA<sub>2</sub> aktiviert.

**[0174]** Die Temperatur hat bekanntermaßen eine drastische und hochgradig nicht lineare Wirkung auf die Aktivierung extrazellulärer PLA<sub>2</sub> im Bereich des Gel-Fluid-Phasenübergangs gesättigter Phospholipid-Doppelschichten. Diese Wirkung wird nicht durch Änderungen im Enzym, sondern durch drastische laterale Strukturänderungen in der Lipid-Doppelschicht verursacht. Es ist möglich, diese Wirkung beim vorliegenden Arzneimittelabgabesystem auszunutzen, wie durch die Daten in [Fig. 12b](#) nahegelegt. Wenn sich die Temperatur der Übergangstemperatur bei 41°C nähert, wird die Geschwindigkeit der Calceinfreisetzung zunehmend gesteigert, wie durch die Zeit der 50-%igen Calceinfreisetzung,  $t_{50\%}$ , gezeigt in der Einfügung in [Fig. 12b](#), quantifiziert. Es wurde bereits vorgeschlagen, Hyperthermie auszunutzen, um die Arzneimittelfreisetzung zu steigern, und dass eine örtliche Erwärmung an zuvor definierten infizierten Bereichen verwendet werden könnte, um Arzneimittel tragende Liposomen durch Ausnutzung der erhöhten Undichtigkeit von Liposomen an ihrem Phasenübergang lokal zu destabilisieren. Bei dem hier vorgeschlagenen neuen Modell-Arzneimittelabgabesystem werden diese hitzeempfindlichen Möglichkeiten über die Hitzeempfindlichkeit extrazellulärer PLA<sub>2</sub> gegenüber den physikalischen Eigenschaften des Trägerliposoms integriert und voll ausgenutzt. Im Gegensatz zu dem Fall, wo die Wärmewirkung nur durch eine lokale Temperaturerhöhung mittels externer Heizquellen an einem zuvor festgelegten infizierten Ort mit minimaler Größe erreicht werden kann, wird die durch PLA<sub>2</sub> gesteuerte Freisetzung überall gesteigert, wo die Temperatur und die Konzentration extrazellulärer PLA<sub>2</sub> erhöht sind, z. B. in infiziertem Gewebe, unabhängig von der Größe des erkrankten Bereichs und ohne dass eine vorangehende Lokalisierung des erkrankten Gewebes notwendig ist.

**[0175]** DPPC, DCPC, D-O-SPC und DPPE-PEG<sub>2000</sub> wurden von Avanti Polar Lipids bezogen. Gereinigte PLA<sub>2</sub> aus Schlangengift (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) war ein großzügiges Geschenk von Dr. R. L. Biltonen. Dieses PLA<sub>2</sub>-Enzym gehört zur Klasse der 14 kD Sekretenzyme mit niedrigem Molekulargewicht, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit menschlicher extrazellulärer Phospholipase A2 aufweisen. Multilamellare Zielliposomen in Gegenwart von fluoreszierendem Calcein in einer selbstlöschenden Konzentration von 20 mM wurden hergestellt, indem ein Film aus D-O-SPC in einer HEPES-Pufferlösung bei pH = 7,5 eine Stunde bei 10°C über der Phasenübergangstemperatur  $T_m = 55^\circ\text{C}$  hydratisiert wurde. Unilamellare Liposomen wurden hergestellt, indem die multilamellaren Liposomen zehn Mal durch zwei gestapelte 100 nm Polycarbonat-Filter extrudiert wurden. Die unilamellaren Liposomen wurden rasch auf eine Temperatur unterhalb der Übergangstemperatur abgekühlt, und die Calcein enthaltenden Liposomen wurden mittels einer mit Sephadex G-50 gepackten Chromatographiesäule von freiem Calcein getrennt. Die unilamellaren Trägerliposomen aus DPPC, DCPC und DPPE-PEG<sub>2000</sub> wurden auf ähnliche Weise hergestellt ( $T_m = 41^\circ\text{C}$ ). Die Calceinfreisetzung aus den Zielliposomen wird durch Messen der Fluoreszenzintensität bei 520 nm nach Anregung bei 492 nm bestimmt. Alle Messungen werden bei Temperaturen durchgeführt, bei denen sich die Lipide der Träger- sowie der Zielliposomen im Gelzustand befinden.

#### Beispiel 11

##### Versuch zur Freisetzung in Abhängigkeit von der Konzentration von Phospholipase A<sub>2</sub>

**[0176]** Multilamellare 1-O-DPPC-Liposomen mit 10 Mol-% 1-O-DPPE-PEG350 wurden in Gegenwart von fluoreszierendem Calcein in einer selbstlöschenden Konzentration von 20 mM hergestellt, indem ein Film aus 90% 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin und 10% 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-350] in einer HEPES-Pufferlösung bei pH

= 7,5 eine Stunde bei 10°C über der Phasenübergangstemperatur hydratisiert wurde. Unilamellare Liposomen wurden ausgebildet, indem die multilamellaren Liposomen zehn Mal durch zwei gestapelte 100 nm Polycarbonat-Filter extrudiert wurden. Die unilamellaren Liposomen wurden rasch auf eine Temperatur unterhalb der Übergangstemperatur abgekühlt, und die Calcein enthaltenden Liposomen wurden mittels einer mit Sephadex G-50 gepackten Chromatographiesäule von freiem Calcein getrennt.

**[0177]** Die Versuchsbedingungen für die durch PLA<sub>2</sub> ausgelöste Calceinfreisetzung waren: 25 µM unilamellare Liposomen, 50, 1 und 0,02 nM PLA<sub>2</sub>, 150 mM KCL, 10 mM HEPES (pH 7,5), 1 mM NaN<sub>3</sub>, 30 µM CaCl<sub>2</sub> und 10 µM EDTA. PLA<sub>2</sub> wurde zu 2,5 ml der thermostatierten Mizellen-Suspension gegeben, die vor der Zugabe von PLA<sub>2</sub> mindestens 300 sek bei 35,5°C ins Gleichgewicht gebracht wurde. Der Prozentsatz an freigesetztem Calcein wird bestimmt als: % Freisetzung =  $100 \times (I_{F(t)} - I_B) / (I_T - I_B)$ , wobei I<sub>F(t)</sub> die gemessene Fluoreszenz zur Zeit t nach der Zugabe des Enzyms ist, I<sub>B</sub> die Hintergrundfluoreszenz ist und I<sub>T</sub> die Gesamtfluoreszenz ist, gemessen nach der Zugabe von Triton X-100, die zur vollständigen Freisetzung von Calcein durch Aufbrechen der 1-O-DPPC-Liposomen führt. [Fig. 14](#) zeigt, dass die ausgelöste Freisetzung von Calcein am langsamsten war, wenn der Liposomen-Suspension nur 0,02 nM PLA<sub>2</sub> zugegeben wurden.

#### Beispiel 12

Hydrolyse negativ geladener Liposomen durch Phospholipase A2 in zellfreier Peritonealflüssigkeit von Ratten

**[0178]** Zellfreie Peritonealflüssigkeit von einer Ratte mit durch Casein ausgelöster akuter Entzündung wurde hergestellt, indem 5 ml 1%iges Natriumcaseinat in die Peritonealhöhle einer männlichen SRPD-Ratte mit einem Gewicht von 250–260 g injiziert wurde. Die Ratte wurde nach 24 Stunden durch Verbluten getötet, und das Entzündungsfluid wurde aus dem Peritoneum aufgefangen und bei 1500 G 20 min zentrifugiert, um eine zellfreie Peritonealflüssigkeit zu erhalten.

**[0179]** Negativ geladene, voll hydratisierte unilamellare Liposomen mit enger Größenverteilung wurden aus 89 Mol-% Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), 10 Mol-% 1-O-Hexadecyl-2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-350] (1-O-DPPE-PEG350) und 1 Mol-% 1,2-bis-(1-Pyrendecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholin (bis-py-DPC) hergestellt. Bis-py-DPC ist ein PLA<sub>2</sub>-Substrat mit zwei benachbarten Pyren-Fluorophoren, die angeregte Dimere (Excimere) ausbilden, die nach Anregung bei 342 nm bei 470 nm emittieren. Die durch Phospholipase katalysierte Hydrolyse trennt die zwei Fluorophoren, die dann bei 380 nm (Monomere) emittieren.

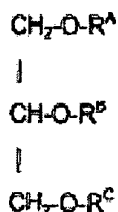
**[0180]** [Fig. 15](#) zeigt die Emissionsspektren, die nach Anregung bei 342 nm von bis-py-DPC, inkorporiert in negativ geladene Liposomen (0,100 mM), vor und nach der Zugabe von 100 nM PLA<sub>2</sub> (Agkistrodon piscivorus piscivorus) erhalten wurden. Die beobachtete Änderung beim Emissionsspektrum nach der durch Phospholipase vermittelten Hydrolyse wird in einem kontinuierlichen Versuch verwendet, bei dem die Excimer-Emission bei 470 nm gleichzeitig mit der Monomer-Emission bei 380 nm, nach Anregung bei 342 nm, gemessen wird. [Fig. 16](#) zeigt das Reaktionszeitprofil der durch Phospholipase A2 von Ratten katalysierten Hydrolyse der negativ geladenen Liposomen. Die katalytische Reaktion wurde durch die Zugabe von zellfreier Peritonealflüssigkeit zu 2,5 ml einer thermostatierten Liposomen-Suspension ausgelöst, die vor der Zugabe von PLA<sub>2</sub> 60 sek ins Gleichgewicht gebracht wurde. Das charakteristische verzögerte Ausbruchsverhalten der Phospholipase wird durch eine plötzliche Zunahme der Monomer-Fluoreszenz bei 380 nm und eine nachfolgende Abnahme der Excimer-Fluoreszenz signalisiert, wie in der Einfügung in [Fig. 16](#) gezeigt.

**[0181]** Die Versuchsbedingungen für das in [Fig. 16](#) gezeigte PLA<sub>2</sub>-Reaktionszeitprofil waren: 0,100 mM unilamellare negativ geladene Liposomen, 100 µl unverdünnte zellfreie Peritonealflüssigkeit, 10 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 150 mM NaCl.

#### Patentansprüche

1. Verwendung eines auf Lipiden basierenden Arzneimittelabgabesystems zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Verhinderung einer parasitären Infektion eines Säugetiers, wobei die parasitäre Infektion durch eine Erhöhung des PLA<sub>2</sub>-Spiegels im Säugetier gekennzeichnet ist und die parasitäre Infektion ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Leishmaniose, Trypanosomiasis, Malaria, Entamoeba histolytica und dem östlichen Leberegel Clonorchis sinensis, umfassend: einen Arzneimittel-Wirkstoff, ausgewählt aus Lysolipid-Derivaten, wobei der Arzneimittel-Wirkstoff in dem auf Lipiden basierenden System in Form eines Arzneimittels vorliegt, wobei das Arzneimittel ein Lipid-Derivat ist, das aufweist: (a) eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen und ein organisches Radikal mit mindestens 7 Koh-

lenstoffatomen und (b) einen hydrophilen Rest, wobei das Arzneimittel ferner ein Substrat für extrazelluläre Phospholipase A2 ist, in dem Maße, dass das organische Radikal hydrolytisch abgespalten werden kann, wohingegen die aliphatische Gruppe im Wesentlichen unangegriffen bleibt, wodurch der Arzneimittel-Wirkstoff in Form eines Lysolipid-Derivats freigesetzt wird, das kein Substrat für Lysophospholipase ist und wobei die Lipid-Derivate Triester von Glycerol gemäß der folgenden Formel sind:



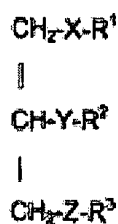
wobei R<sup>A</sup> und R<sup>B</sup> Fettsäurekomponenten (C<sub>9-30</sub>-Alkyl/Alkylen/Alkyldien/Alkyltrien/Alkyltetraen-C(=O)-) sind und R<sup>C</sup> eine Phosphatidsäure (PO<sub>2</sub>-OH) oder ein Derivat von Phosphatidsäure ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der erhöhte PLA<sub>2</sub>-Spiegel auf ein bestimmtes Gewebe und/oder Organ des Säugetiers örtlich beschränkt ist, wobei das Gewebe und/oder Organ mit dem Parasiten infiziert ist.

3. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die parasitäre Infektion die Leber und/oder die Milz des Säugetiers betrifft.

4. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das organische Radikal, das hydrolytisch abspaltbar ist, ein Arzneimittelhilfsstoff oder ein Wirksamkeitsmodifikator für den Arzneimittel-Wirkstoff ist.

5. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Arzneimittel ein Lipid-Derivat gemäß der folgenden Formel ist:



wobei

X und Z unabhängig ausgewählt sind aus O, CH<sub>2</sub>, NH, NMe, S, S(O) und S(O)<sub>2</sub>,

Y -OC(O)- ist, wobei Y dann mit R<sup>2</sup> entweder über das Sauerstoff- oder das Carbonyl-Kohlenstoffatom verbunden ist,

R<sup>1</sup> eine aliphatische Gruppe gemäß der Formel Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup> ist,

R<sup>2</sup> ein organischer Rest mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen ist,

wobei Y<sup>1</sup> -(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>-(CH=CH)<sub>n2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>-(CH=CH)<sub>n4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n5</sub>-(CH=CH)<sub>n6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n7</sub>-(CH=CH)<sub>n8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n9</sub> ist und die Summe von n1 + 2n2 + n3 + 2n4 + n5 + 2n6 + n7 + 2n8 + n9 eine ganze Zahl von 9 bis 29 ist, n1 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 29 ist, n3 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist, n5 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 17 ist, n7 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 14 ist und n9 Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 11 ist und n2, n4, n6 und n8 unabhängig jeweils Null oder 1 sind und Y<sup>2</sup> CH<sub>3</sub> oder CO<sub>2</sub>H ist, wobei jedes Y<sup>1</sup>-Y<sup>2</sup> unabhängig mit Halogen oder C<sub>1-4</sub>-Alkyl substituiert sein kann,

R<sup>3</sup> ausgewählt ist aus Phosphatidsäure (PO<sub>2</sub>-OH), Derivaten von Phosphatidsäure und Bioisosteren von Phosphatidsäure und Derivaten davon.

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei R<sup>2</sup> eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen ist.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei R<sup>2</sup> eine Gruppe gemäß der Formel Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup> ist.

8. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mindestens ein Teil des Arzneimittels der in den Ansprüchen 5–7 definierten Formel entspricht, wobei R<sup>3</sup> ein Derivat von Phosphatidsäure ist, an der ein Polymer, ausgewählt aus Polyethylenglykol, Polymilchsäure, Polyglykolsäure, Polymilchsäure-Polyglykolsäure-Copolymeren, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polymethoxazolin, Polyethyloxazolin, Polyhydroxypropylmethacrylamid, Polymethacrylamid, Polydimethylacrylamid und derivatisierten Cellulosen, kovalent be-

festigt ist.

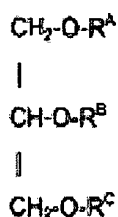
9. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Arzneimittel aus 15–100 Mol-% des gesamten entwässerten auf Lipiden basierenden Systems besteht.

10. Verwendung nach Anspruch 8–9, wobei das Lipopolymer, falls vorhanden, aus 0,1–10 Mol-% des gesamten entwässerten Systems besteht.

11. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das auf Lipiden basierende System in Form von Liposomen vorliegt.

12. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, das in Form von Liposomen vorliegt, wobei ein zweiter Arzneistoff inkorporiert ist.

13. Verwendung eines auf Lipiden basierenden Arzneimittelabgabesystems, das einen zweiten Arzneistoff umfasst, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Verhinderung einer parasitären Infektion eines Säugetiers, wobei die parasitäre Infektion durch eine Erhöhung des PLA<sub>2</sub>-Spiegels im Säugetier gekennzeichnet ist und die parasitäre Infektion ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Leishmaniose, Trypanosomiasis, Malaria, Entamoeba histolyticosis und dem östlichen Leberegel Clonorchis sinensis, wobei der zweite Arzneistoff in das System inkorporiert ist, wobei das System ein Lipid-Derivat einschließt, das aufweist: (a) eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen und ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen und (b) einen hydrophilen Rest, wobei das Lipid-Derivat ferner ein Substrat für extrazelluläre Phospholipase A2 ist, in dem Maße, dass das organische Radikal hydrolytisch abgespalten werden kann, wohingegen die aliphatische Gruppe im Wesentlichen unangegriffen bleibt, so dass sich ein organisches Säure-Fragment oder ein organisches Alkohol-Fragment und ein Lysolipid-Fragment ergeben, wobei das Lysolipid-Fragment kein Substrat für Lysophospholipase ist und wobei die Lipid-Derivate Triester von Glycerol gemäß der folgenden Formel sind:



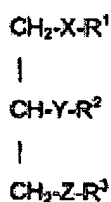
wobei R<sup>A</sup> und R<sup>B</sup> Fettsäurekomponenten (C<sub>9-30</sub>-Alkyl/Alkylen/Alkyldien/Alkyltrien/Alkyltetraen-C(=O)-) sind und R<sup>C</sup> eine Phosphatidsäure (PO<sub>2</sub>-OH) oder ein Derivat von Phosphatidsäure ist.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei der erhöhte PLA<sub>2</sub>-Spiegel auf ein bestimmtes Gewebe und/oder Organ des Säugetiers örtlich beschränkt ist, wobei das Gewebe und/oder Organ mit dem Parasiten infiziert ist.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 oder 14, wobei die parasitäre Infektion die Leber und/oder die Milz des Säugetiers betrifft.

16. Verwendung nach einem der Ansprüche 13–15, wobei das organische Radikal, das hydrolytisch abgespalten werden kann, ein Arzneimittelhilfsstoff oder ein Wirksamkeitsmodifikator für den zweiten Arzneistoff ist.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 13–16, wobei das Lipid-Derivat ein Lipid-Derivat gemäß der folgenden Formel ist:



wobei

X und Z unabhängig ausgewählt sind aus O, CH<sub>2</sub>, NH, NMe, S, S(O) und S(O)<sub>2</sub>,

Y -OC(O)- ist, wobei Y dann mit R<sup>2</sup> entweder über das Sauerstoff- oder das Carbonyl-Kohlenstoffatom verbunden ist,

R<sup>1</sup> eine aliphatische Gruppe gemäß der Formel Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup> ist,

R<sup>2</sup> ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen ist,

wobei Y<sup>1</sup> -(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>-(CH=CH)<sub>n2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>-(CH=CH)<sub>n4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n5</sub>-(CH=CH)<sub>n6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n7</sub>-(CH=CH)<sub>n8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n9</sub> ist und die Summe von n<sub>1</sub> + 2n<sub>2</sub> + n<sub>3</sub> + 2n<sub>4</sub> + n<sub>5</sub> + 2n<sub>6</sub> + n<sub>7</sub> + 2n<sub>8</sub> + n<sub>9</sub> eine ganze Zahl von 9 bis 29 ist, n<sub>1</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 29 ist, n<sub>3</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist, n<sub>5</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 17 ist, n<sub>7</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 14 ist und n<sub>9</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 11 ist und n<sub>2</sub>, n<sub>4</sub>, n<sub>6</sub> und n<sub>8</sub> unabhängig jeweils Null oder 1 sind und Y<sup>2</sup> CH<sub>3</sub> oder CO<sub>2</sub>H ist, wobei jedes Y<sup>1</sup>-Y<sup>2</sup> unabhängig mit Halogen oder C<sub>1-4</sub>-Alkyl substituiert sein kann,

R<sup>3</sup> ausgewählt ist aus Phosphatidsäure (PO<sub>2</sub>-OH), Derivaten von Phosphatidsäure und Bioisosteren von Phosphatidsäure und Derivaten davon.

18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei R<sup>2</sup> eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen ist.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei R<sup>2</sup> eine Gruppe gemäß der Formel Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup> ist.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 13–19, wobei mindestens ein Teil des Arzneimittels der in Anspruch 17 definierten Formel entspricht, wobei R<sup>3</sup> ein Derivat von Phosphatidsäure ist, an die ein Polymer, ausgewählt aus Polyethylenglykol, Polymilchsäure, Polyglykolsäure, Polymilchsäure-Polyglykolsäure-Copolymeren, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polymethoxazolin, Polyethyloxazolin, Polyhydroxypropylmethacrylamid, Polymethacrylamid, Polydimethylacrylamid und derivatisierten Cellulosen, kovalent befestigt ist.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 13–20, wobei das Lipid-Derivat aus 15–100 Mol-% des gesamten entwässerten Systems besteht.

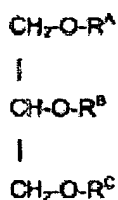
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 20–21, wobei das Lipopolymer, falls vorhanden, aus 0,1–10 Mol-% des gesamten entwässerten Systems besteht.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 13–22, wobei das System in Form von Liposomen vorliegt.

24. Verwendung nach Anspruch 13–23, wobei der zweite Arzneistoff ein therapeutischer und/oder prophylaktischer Wirkstoff ist, ausgewählt aus (i) Antiparasitika, (ii) Antibiotika und (iii) Antiphlogistika.

25. Verwendung eines auf Lipiden basierenden Systems zur Herstellung eines Diagnostikums zum Nachweis oder zur Quantifizierung einer parasitären Infektion eines Säugetiers, wobei die parasitäre Infektion durch eine Erhöhung des PLA<sub>2</sub>-Spiegels im Säugetier gekennzeichnet ist und die parasitäre Infektion ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Leishmaniose, Trypanosomiasis, Malaria, Entamoeba histolytica und dem östlichen Leberegel Clonorchis sinensis, wobei das System einen zweiten Stoff und ein Lipid-Derivat einschließt, das aufweist: (a) eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen und ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen und (b) eine hydrophile Komponente, wobei das Lipid-Derivat ferner ein Substrat für extrazelluläre Phospholipase A2 ist, in dem Maße, dass das organische Radikal hydrolytisch abgespalten werden kann, wohingegen die aliphatische Gruppe im Wesentlichen unangegriffen bleibt, so dass sich ein organisches Säure-Fragment oder ein organisches Alkohol-Fragment und ein Lysolipid-Fragment ergeben, wobei das Lysolipid-Fragment kein Substrat für Lysophospholipase ist und der zweite Stoff eine Markierung ist

und wobei die Lipid-Derivate Triester von Glycerol gemäß der folgenden Formel sind:



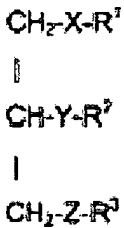
wobei R<sup>A</sup> und R<sup>B</sup> Fettsäurekomponenten (C<sub>9-30</sub>-Alkyl/Alkylen/Alkyldien/Alkyltrien/Alkyltetraen-C(=O)-) sind und R<sup>C</sup> eine Phosphatidsäure (PO<sub>2</sub>-OH) oder ein Derivat von Phosphatidsäure ist.

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei der erhöhte PLA<sub>2</sub>-Spiegel auf ein bestimmtes Gewebe und/oder Organ des Säugetiers örtlich beschränkt ist, wobei das Gewebe und/oder Organ mit dem Parasiten infiziert ist.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 oder 26, wobei die parasitäre Infektion die Leber und/oder

die Milz des Säugetiers betrifft.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 25–27, wobei das Lipid-Derivat ein Lipid-Derivat gemäß der folgenden Formel ist:



wobei

X und Z unabhängig ausgewählt sind aus O, CH<sub>2</sub>, NH, NMe, S, S(O) und S(O)<sub>2</sub>,

Y -OC(O)- ist, wobei Y dann mit R<sup>2</sup> entweder über das Sauerstoff- oder das Carbonyl-Kohlenstoffatom verbunden ist,

R<sup>1</sup> eine aliphatische Gruppe gemäß der Formel Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup> ist,

R<sup>2</sup> ein organisches Radikal mit mindestens 7 Kohlenstoffatomen ist,

wobei Y<sup>1</sup> -(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>-(CH=CH)<sub>n2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>-(CH=CH)<sub>n4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n5</sub>-(CH=CH)<sub>n6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n7</sub>-(CH=CH)<sub>n8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n9</sub> ist und die Summe von n<sub>1</sub> + 2n<sub>2</sub> + n<sub>3</sub> + 2n<sub>4</sub> + n<sub>5</sub> + 2n<sub>6</sub> + n<sub>7</sub> + 2n<sub>8</sub> + n<sub>9</sub> eine ganze Zahl von 9 bis 29 ist, n<sub>1</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 29 ist, n<sub>3</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 20 ist, n<sub>5</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 17 ist, n<sub>7</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 14 ist und n<sub>9</sub> Null oder eine ganze Zahl von 1 bis 11 ist und n<sub>2</sub>, n<sub>4</sub>, n<sub>6</sub> und n<sub>8</sub> unabhängig jeweils Null oder 1 sind und Y<sup>2</sup> CH<sub>3</sub> oder CO<sub>2</sub>H ist, wobei jedes Y<sup>1</sup>-Y<sup>2</sup> unabhängig mit Halogen oder C<sub>1-4</sub>-Alkyl substituiert sein kann,

R<sup>3</sup> ausgewählt ist aus Phosphatidsäure (PO<sub>2</sub>-OH), Derivaten von Phosphatidsäure und Bioisosteren von Phosphatidsäure und Derivaten davon.

29. Verwendung nach Anspruch 28, wobei R<sup>2</sup> eine aliphatische Gruppe mit einer Länge von mindestens 7 Kohlenstoffatomen ist.

30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei R<sup>2</sup> eine Gruppe gemäß der Formel Y<sup>1</sup>Y<sup>2</sup> ist.

31. Verwendung nach einem der Ansprüche 25–30, wobei das Lipid-Derivat 15–100 Mol-% des gesamten entwässerten Systems ausmacht.

32. Verwendung nach einem der Ansprüche 25–31, wobei die Markierung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc, <sup>67</sup>Ga, <sup>11</sup>C, Gd, Mn, Eisenoxid, Argon, Stickstoff, Iod, Brom und Barium.

33. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Medikament oder Diagnostikum für die systemische Verabreichung geeignet ist.

34. Verwendung nach Anspruch 33, wobei das Medikament oder Diagnostikum als Medikament für die intravenöse Verabreichung formuliert ist.

35. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die parasitäre Infektion verursacht ist durch einen parasitären Organismus, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Leishmania major Friedlin, Leishmania (viannia) gr., Leishmania mexicana, Leishmania tropica, Leishmania donovani (infantum), Leishmania aethiopica, Leishmania amazonensis, Leishmania enriettii, Leishmania chagasi, Leishmania pifanoi, Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, Trypanosoma cruzi (Auslöser der Chagas-Krankheit), Trypanosoma brucei, Trypanosoma equiperdum, Trypanosoma evansi, Entamoeba histolytica und Clonorchis sinensis.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

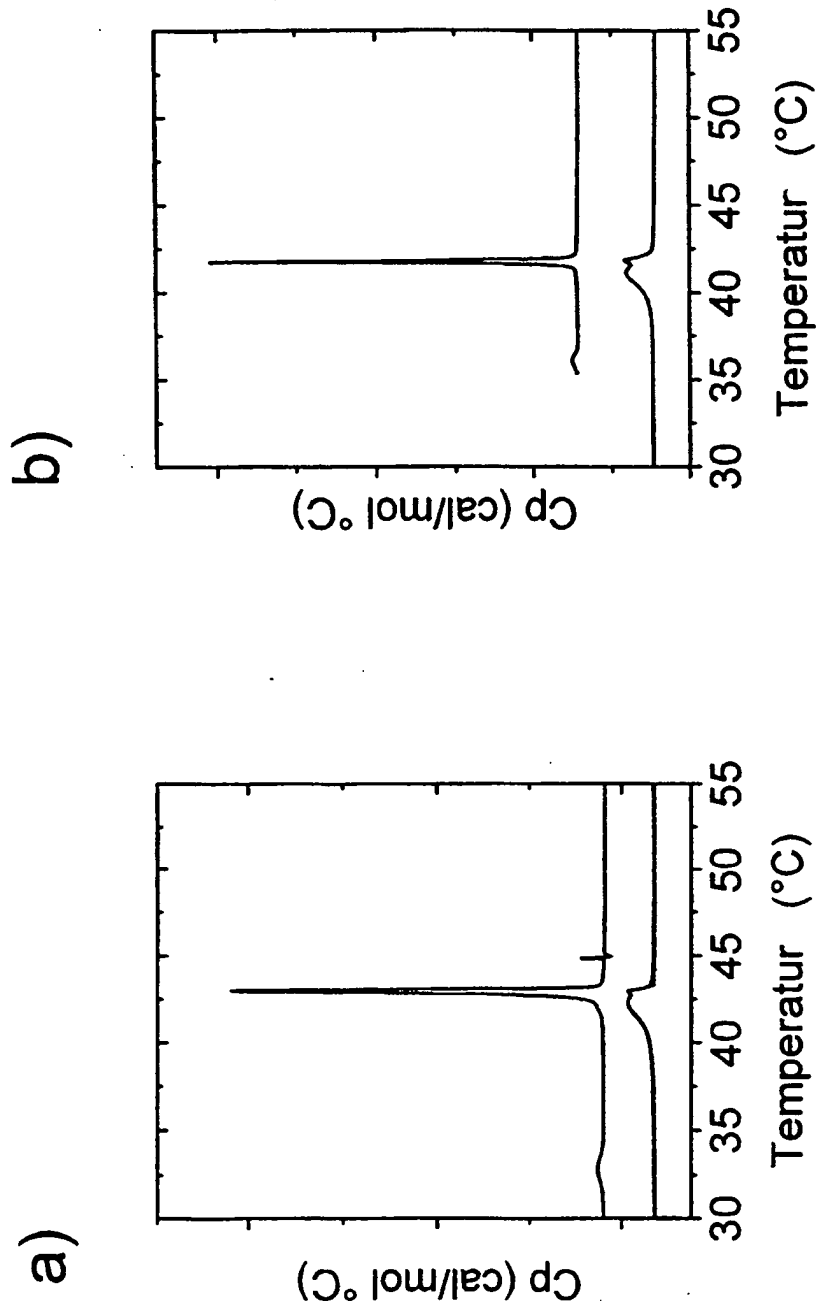




Fig. 2

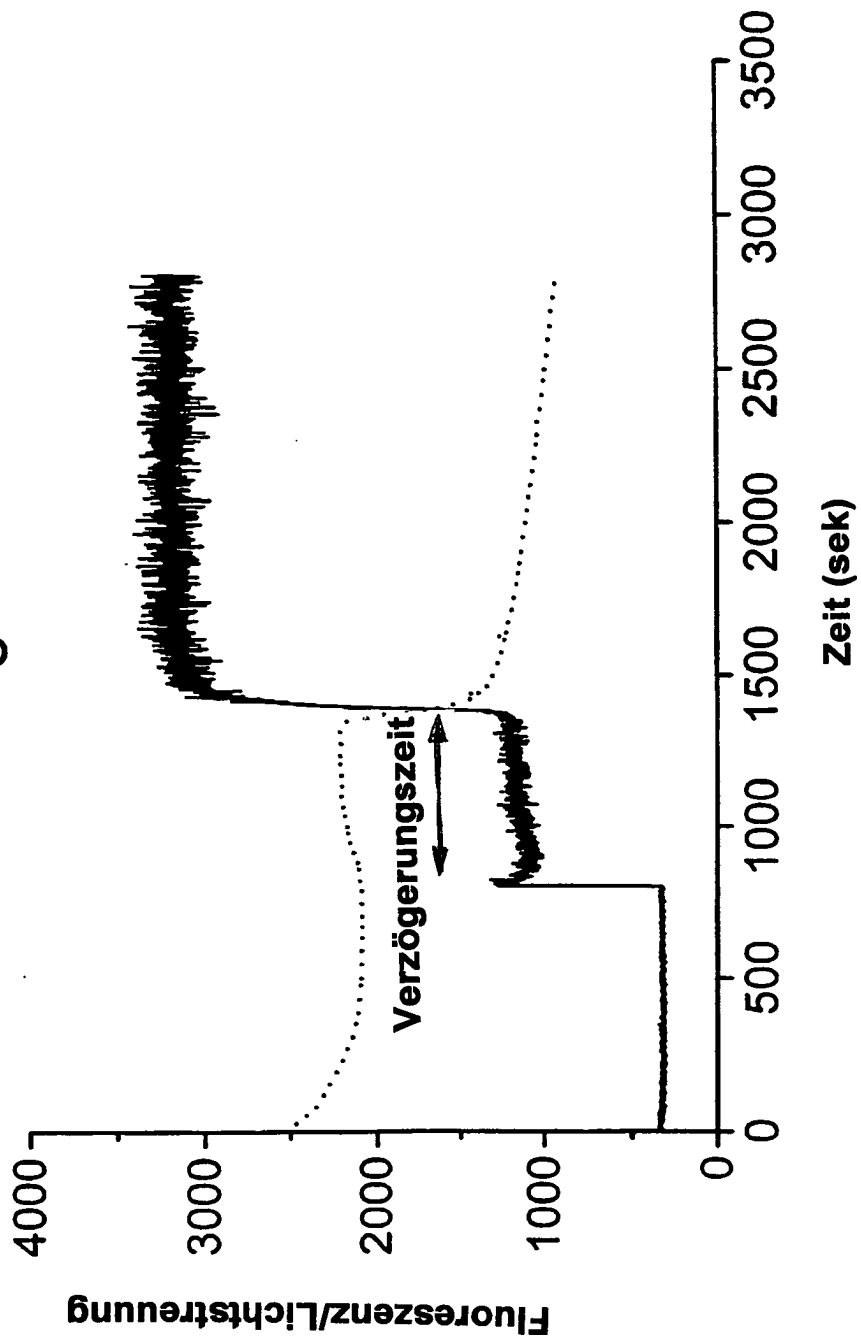


Fig. 3

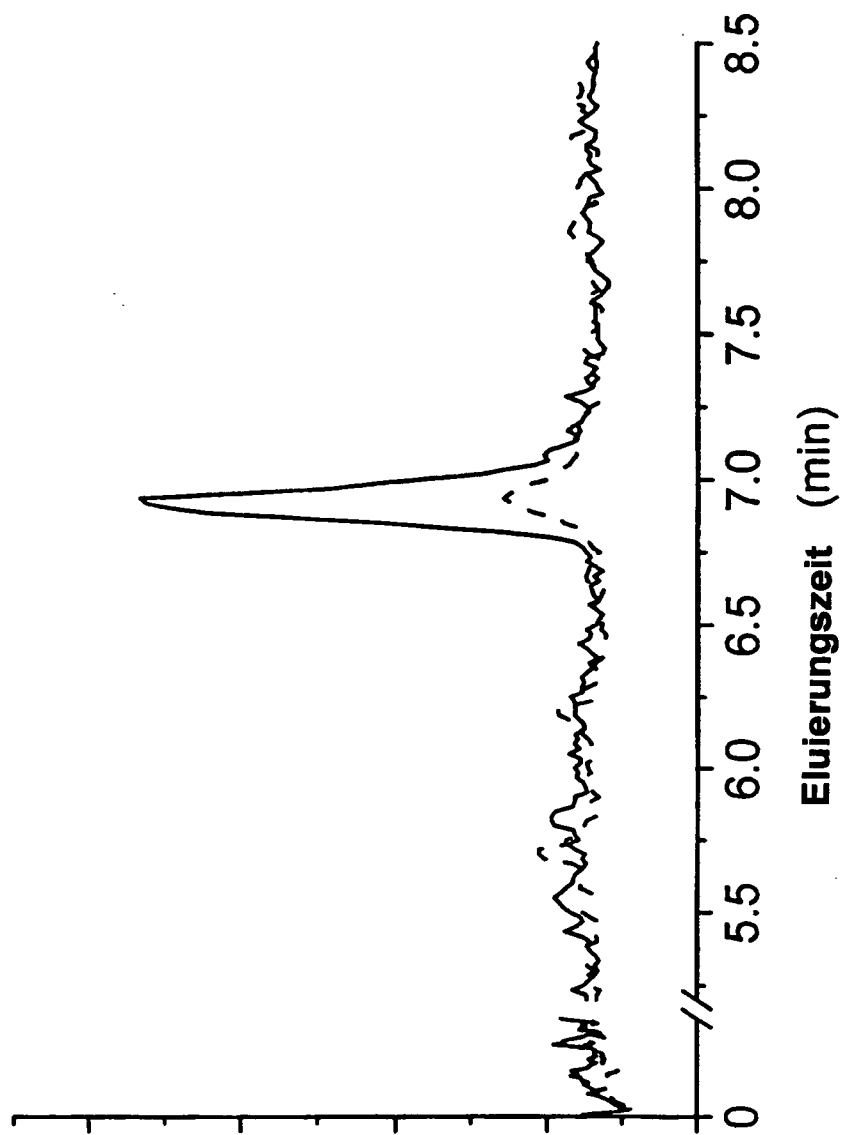


Fig. 4

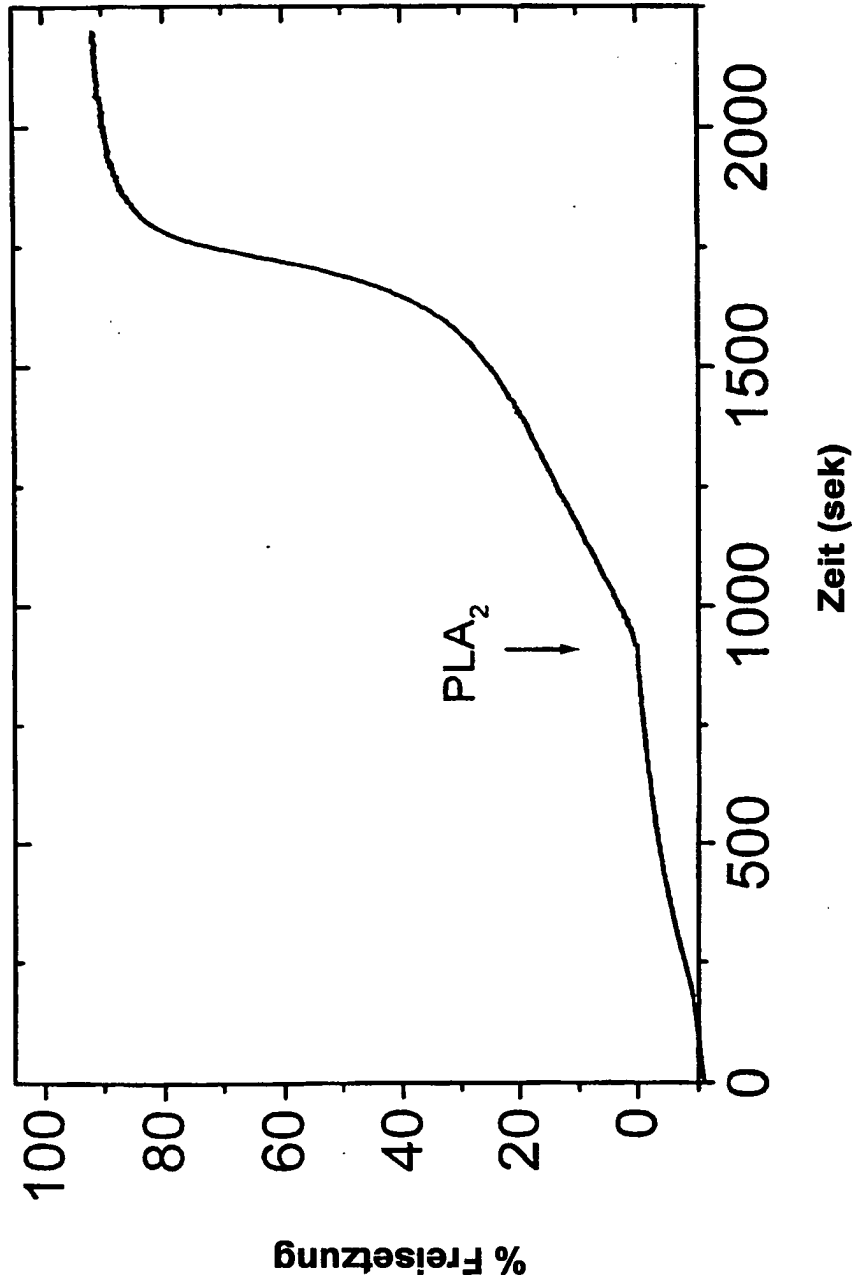


Fig. 5

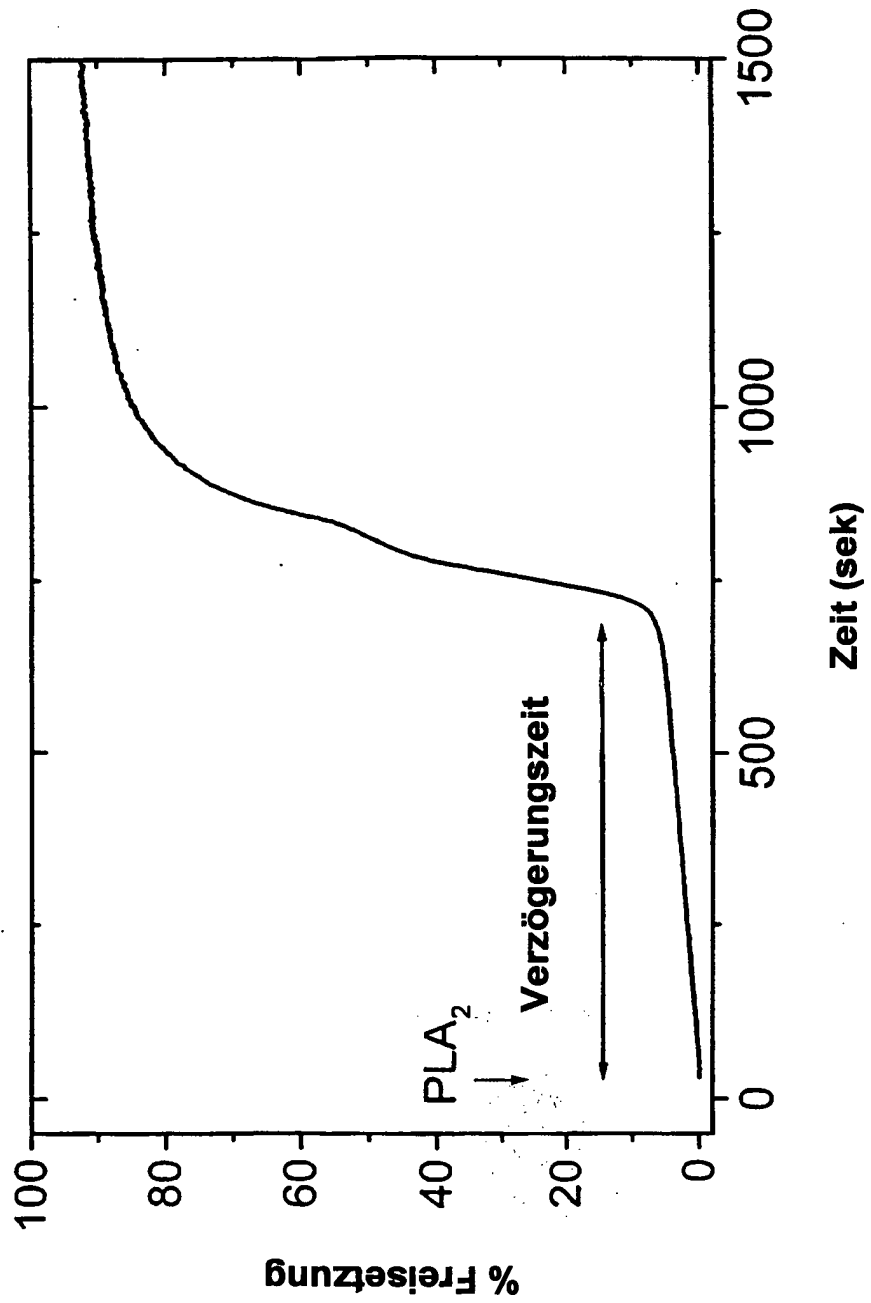


Fig. 6

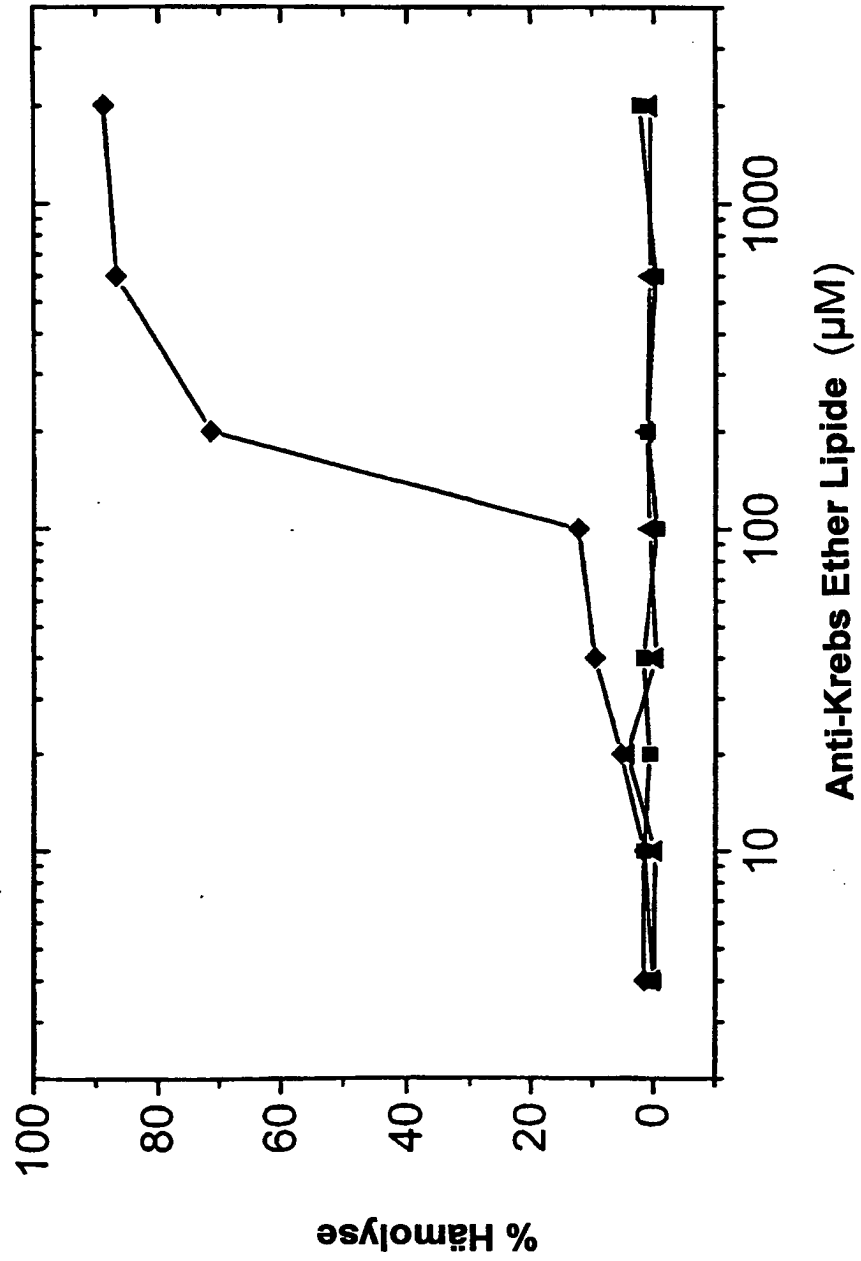
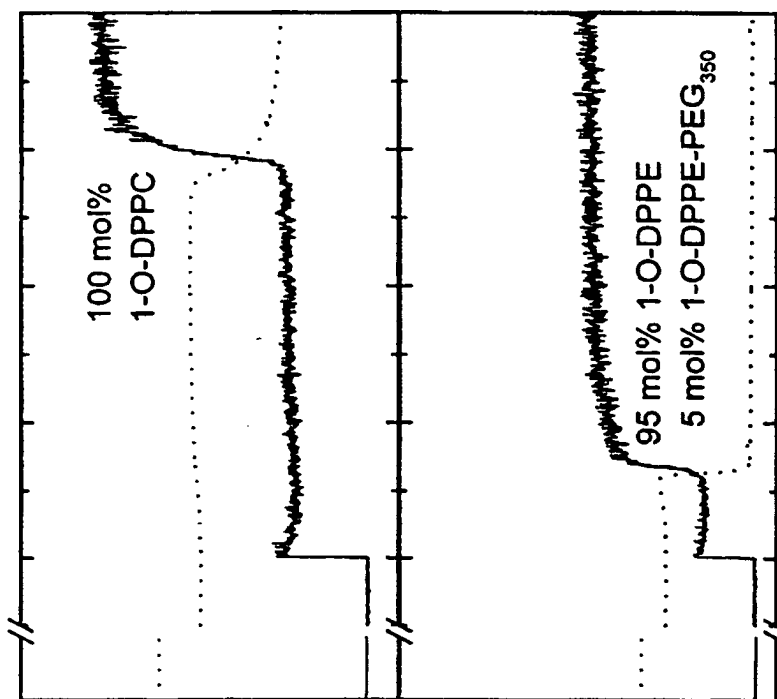
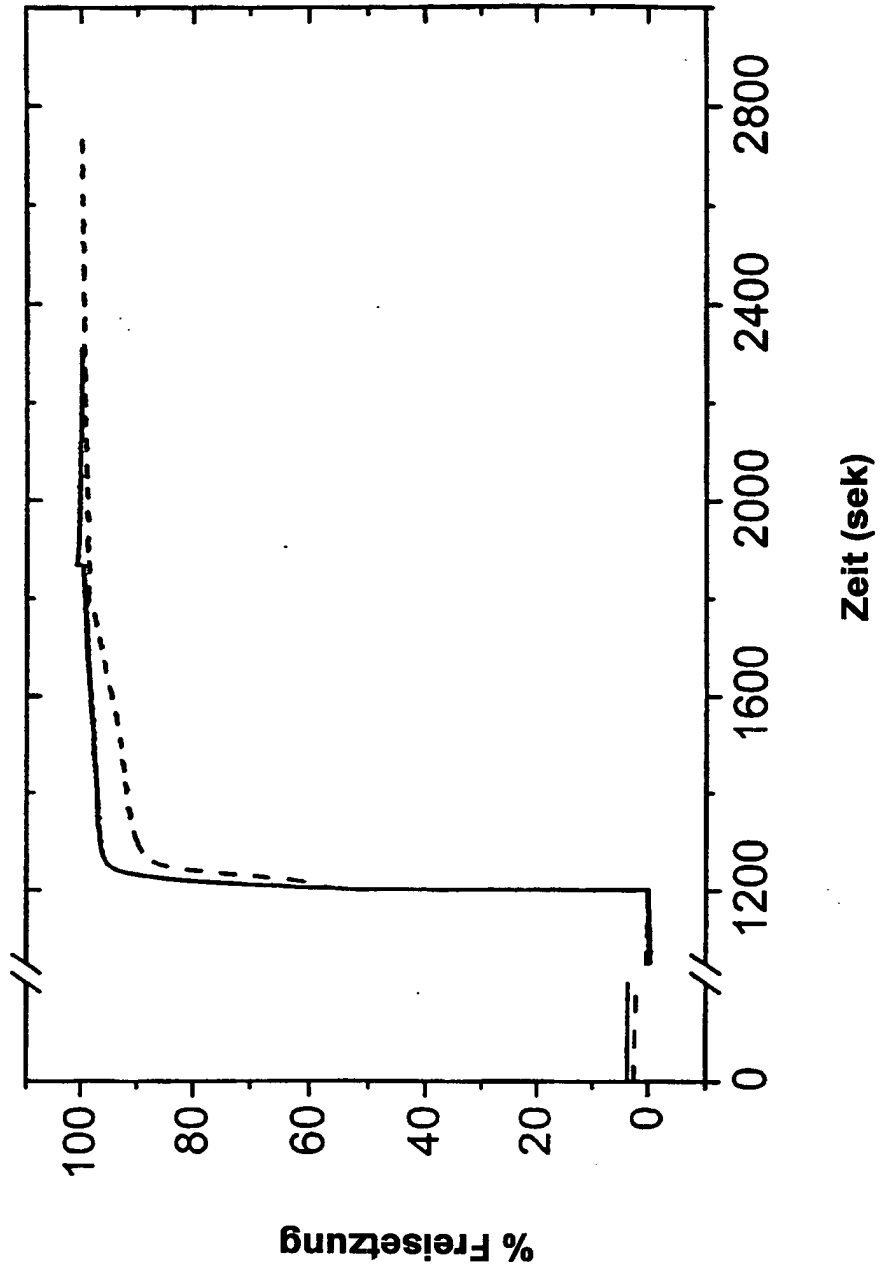


Fig. 7



Fluoreszenz/Lichtstreuung

Fig. 8



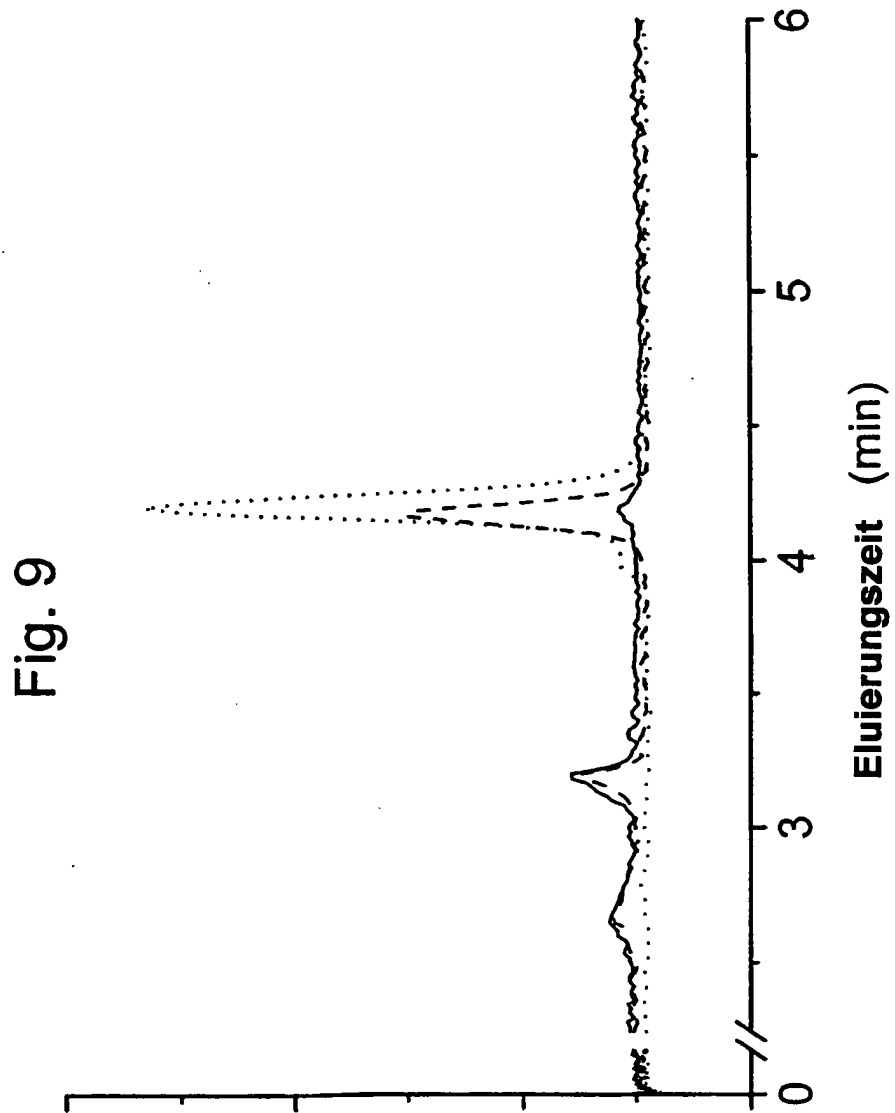




Fig. 10

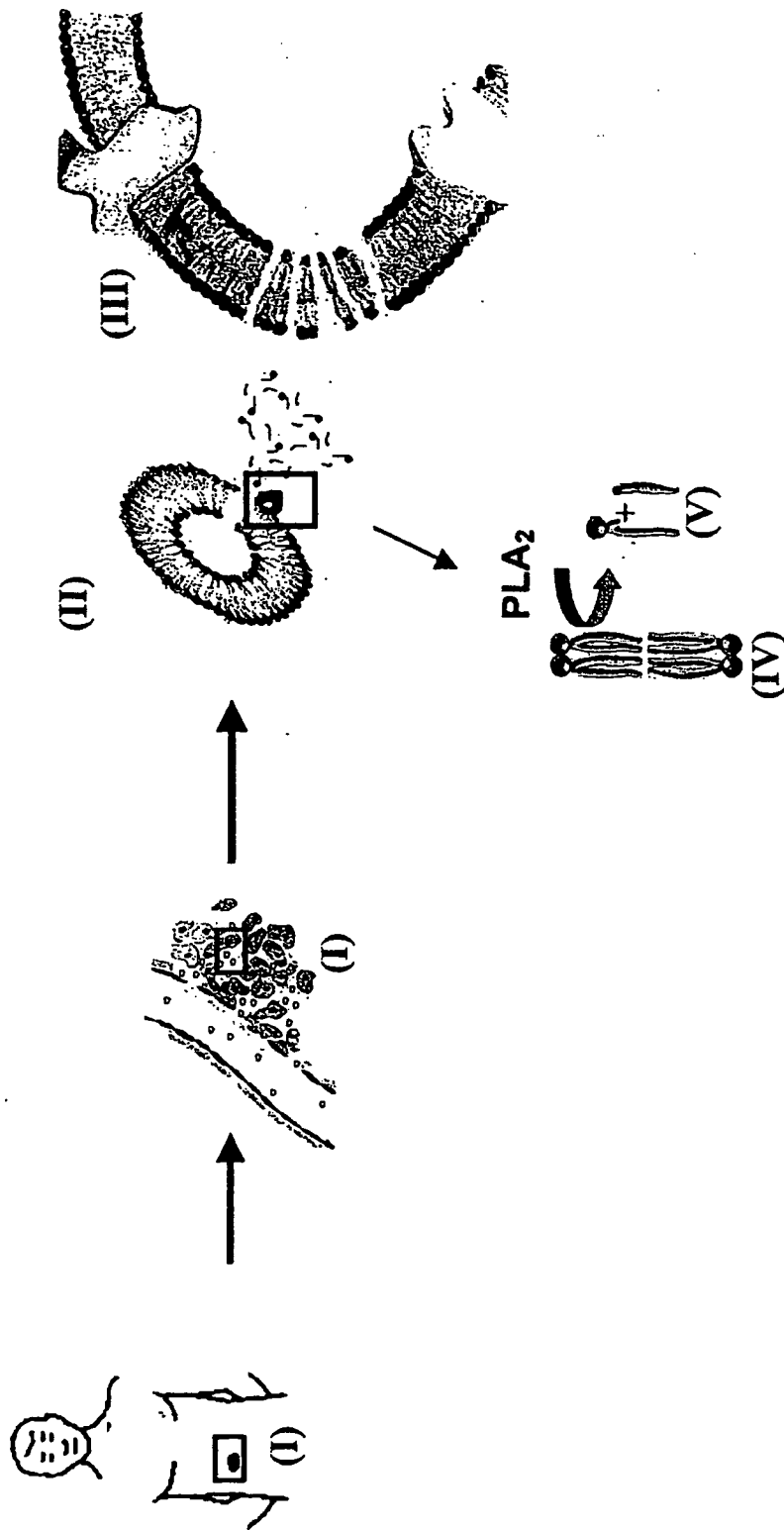


Fig. 11

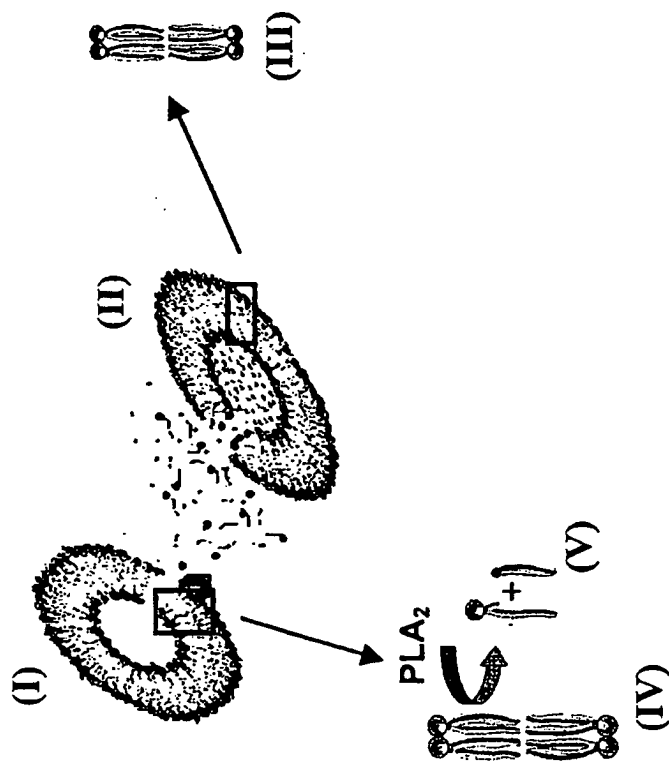


Fig. 12a

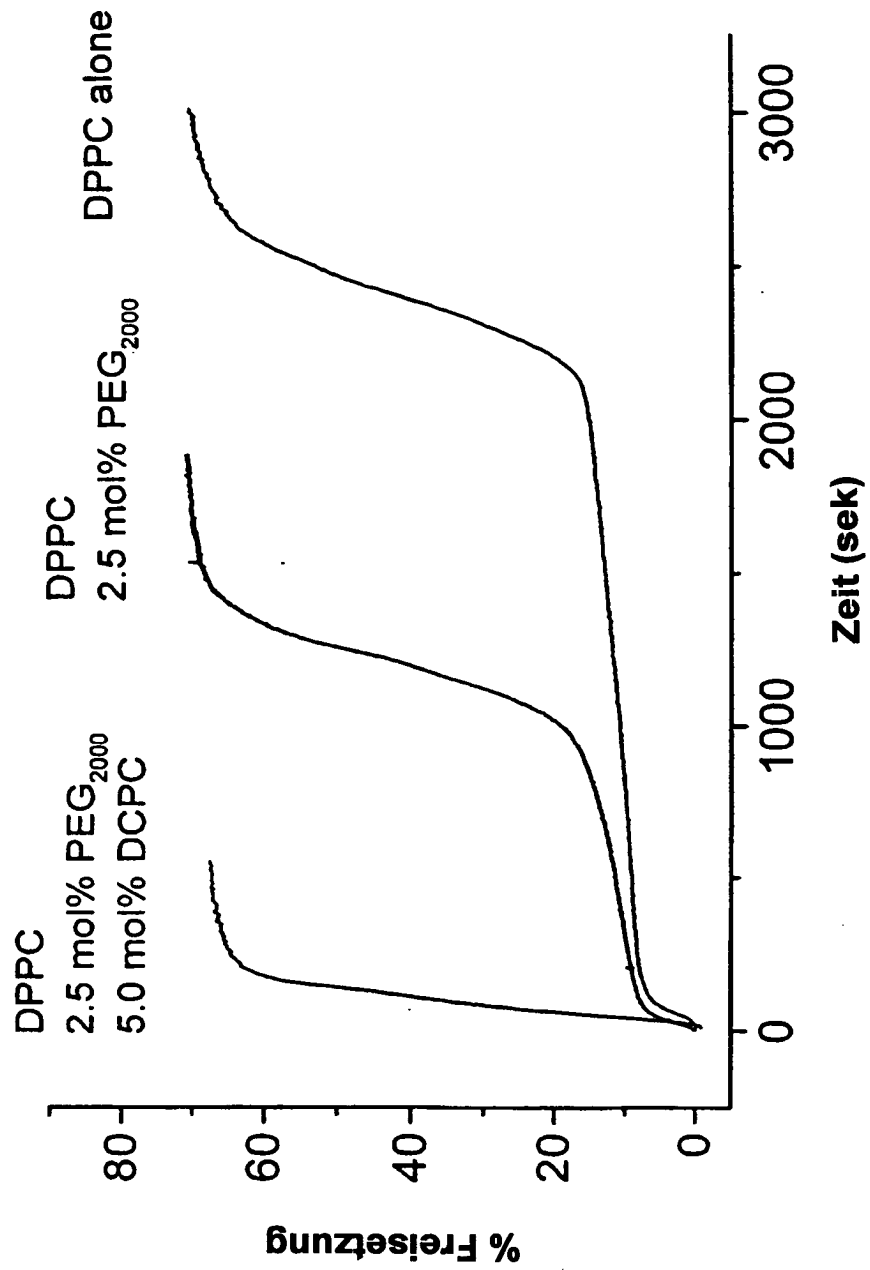


Fig. 12b

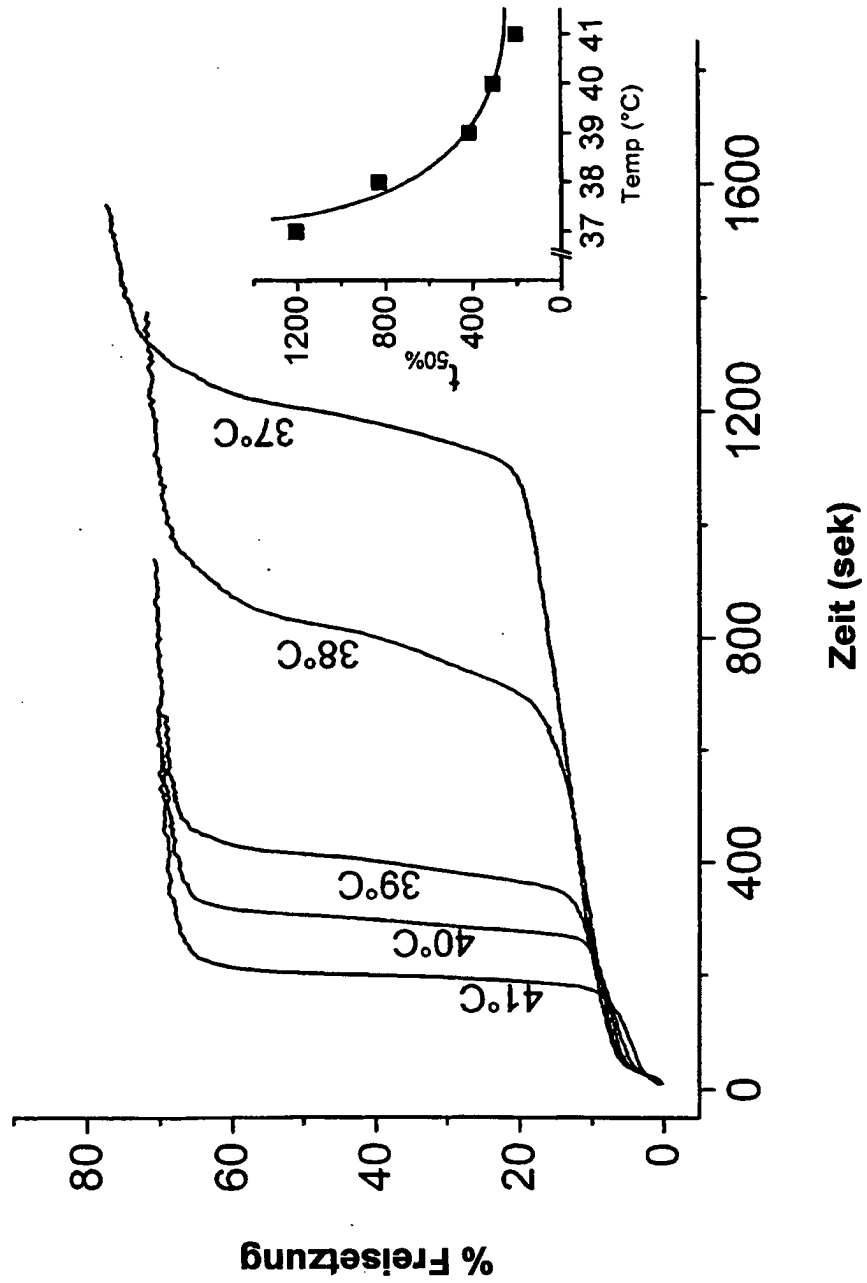


Fig. 13

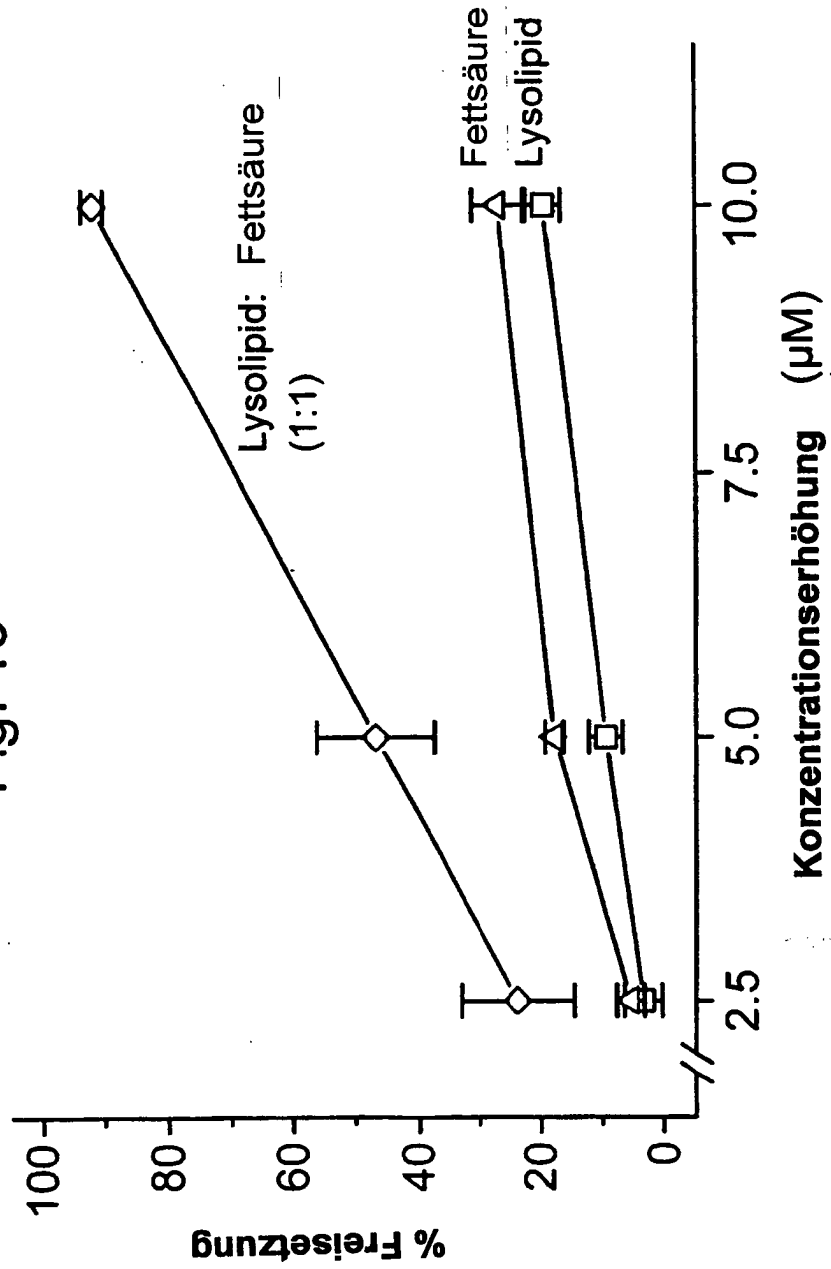


Fig. 14

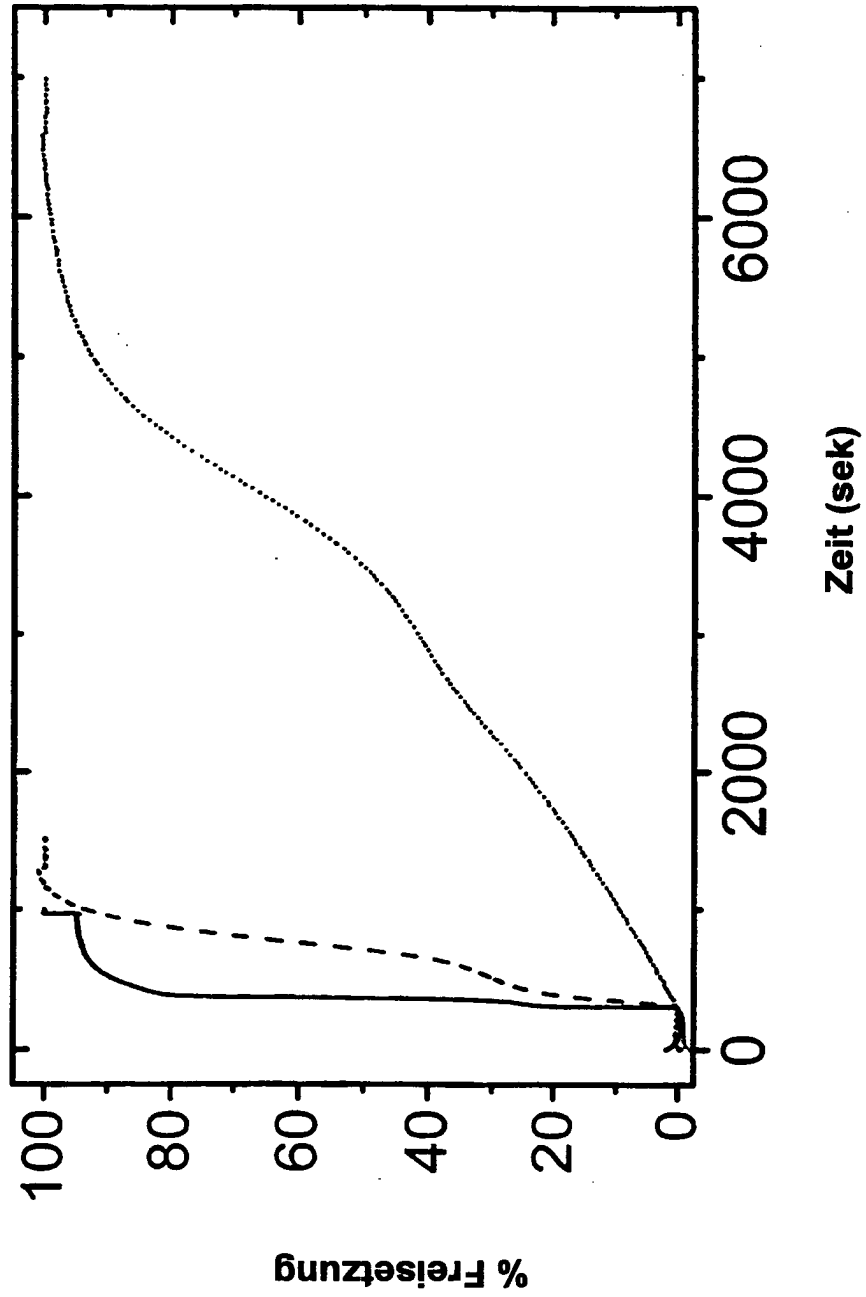


Fig. 15

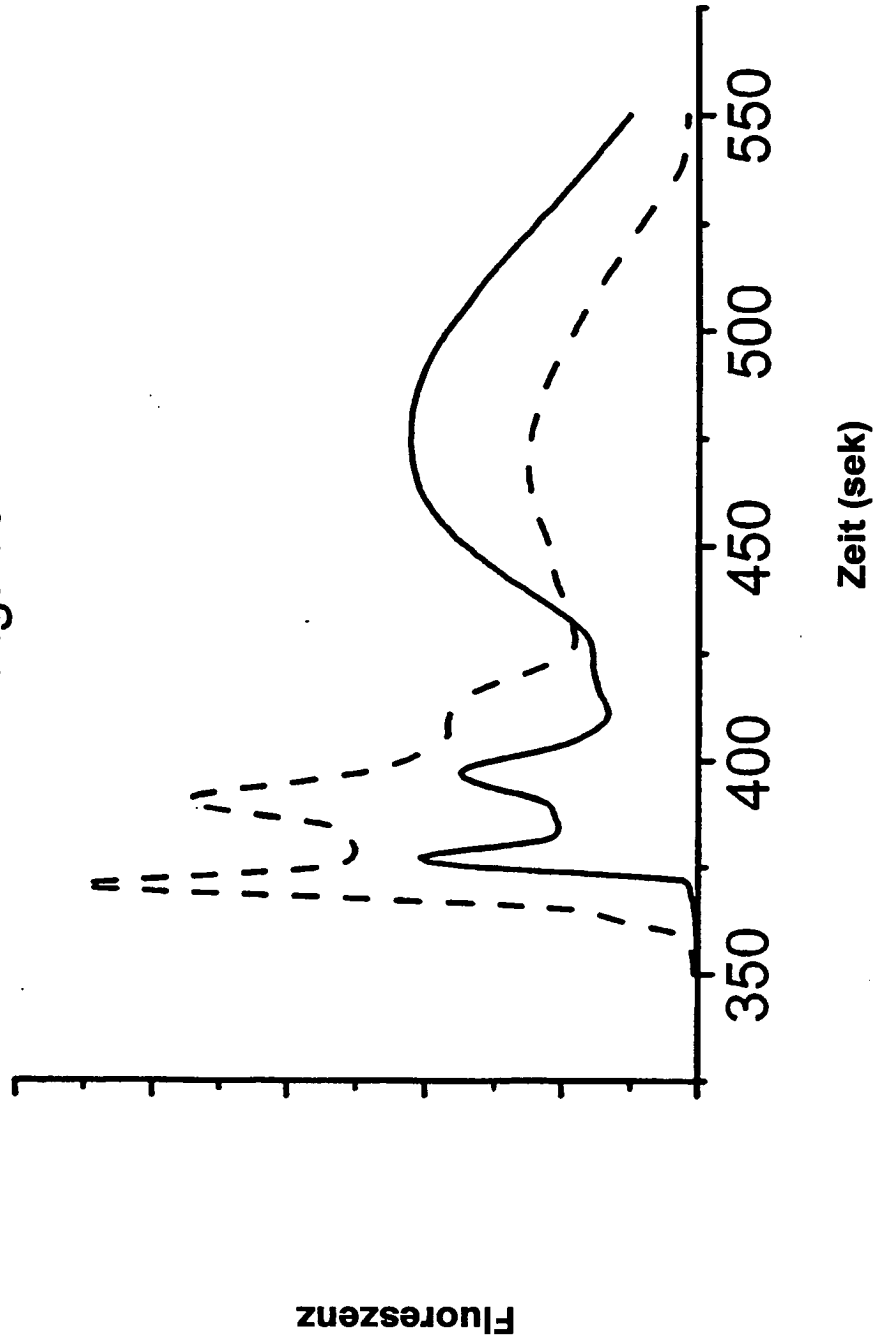


Fig. 16

