



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **280 693 A1**5(51) **A 61 K 9/50**
A 61 K 31/70
A 61 K 31/65

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 61 K / 254 475 5	(22)	02.09.83	(44)	18.07.90
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Rudower Chaussee 5, Berlin, 1199, DD

(72) Arndt, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54) **Verfahren zur liposomalen Verkapselung von Pharmaka**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur liposomalen Verkapselung von Pharmaka mit dem Ziel eines lange Zeit lagerfähigen Zwischenproduktes, das einfach und schnell unmittelbar vor Applikation in Liposomen umgewandelt werden kann. Erfindungsgemäß werden wasser- oder lipidlösliche Substanzen mit einer geeigneten lipophilen Verbindung zur Wechselwirkung gebracht unter Bildung eines lipidlöslichen Komplexes. Dieser Komplex wird mit Phospholipiden und anderen nichtwässrigen Liposomenbestandteilen gemischt. Zur Gewinnung von Liposomen wird das Gemisch, das vorzugsweise in einer geschlossenen Ampulle unter Schutzgas lange Zeit haltbar ist, mit Wasser oder Puffer intensiv geschüttelt. Diese Liposomenpräparation wird ohne Aufarbeitung appliziert.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur liposomalen Verkapselung von Pharmaka, vorzugsweise Cytostatika, **dadurch gekennzeichnet**, daß diese wasser- oder lipidlöslichen Substanzen mit einer geeigneten lipophilen Verbindung zur Wechselwirkung gebracht werden unter Bildung eines lipidlöslichen Komplexes und mit weiteren Liposomenbestandteilen, vorzugsweise Phospholipiden, eine stabile, lange Zeit lagerfähige Mischung hergestellt wird, die durch Zusatz von Wasser bzw. Puffer und intensives Schütteln in eine Liposomenpräparation umgewandelt werden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Herstellung des lipidlöslichen Komplexes vorzugsweise geladene Phospholipide mit einer der einzuschließenden Substanz entgegengesetzten Ladung verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur liposomalen Verkapselung von Pharmaka, insbesondere Cytostatika. Anwendungsgebiet ist die Medizin bzw. die pharmazeutische Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Unter der Zielstellung einer verbesserten therapeutischen Effektivität bzw. reduzierter Nebenwirkungen werden die verschiedensten pharmakologisch wirksamen Verbindungen in Liposomen eingeschlossen (Übersicht Knight, Herausgeber, *Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981). Liposomen (smektische Mesophasen) sind geschlossene, vesikuläre Doppelschichtstrukturen aus geeigneten amphiphilen Verbindungen, z. B. Phospholipiden, mit der Fähigkeit des Einschlusses von Substanzen, z. B. Wirkstoffen. Dabei kann die Einlagerung sowohl in der wäßrigen als auch in der Lipidphase erfolgen. Zur Formierung von Liposomen sind verschiedene Techniken bekannt, die Vesikel unterschiedlicher Struktur und Größe ergeben. Durch diese Techniken wird jedoch nur ein Teil des Wirkstoffes eingeschlossen, so daß nachfolgend die freie, nicht verkapselte Substanz abgetrennt werden muß, z. B. durch Gelfiltration, Dialyse oder Zentrifugation.

Bei Lagerung von wirkstoffhaltigen Liposomen erfolgt der Austritt von Substanz in Abhängigkeit von ihrer Natur, Lipidzusammensetzung und Temperatur. Für lipidlösliche Pharmaka beschreibt das belgische Patent 866 697 der Imperial Chemical Industries Ltd. die Gewinnung eines lagerfähigen Zwischenproduktes.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur liposomalen Verkapselung von Pharmaka, insbesondere Cytostatika, ohne nachfolgende Trennungsoperation und unter Gewinnung eines lange Zeit lagerfähigen Zwischenproduktes zu entwickeln. Eine weitere Aufgabe ist die Gestaltung der Einschlußprozedur in einer solchen Einfachheit und Schnelligkeit, daß ihre Durchführung unmittelbar vor Applikation erfolgen kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß werden wasser- und lipidlösliche Pharmaka, vorzugsweise Cytostatika, mit einer geeigneten lipophilen Substanz zur Wechselwirkung gebracht. Im Ergebnis dieser Wechselwirkung bildet sich zwischen Pharmakon und lipophilem Gegenmolekül ein stabiler, hydrophober Komplex. Ursache dieser stabilen Anlagerung sind Salzbildung, Ionenpaarbildung, Knüpfung einer konvalenten Bindung bzw. hydrophobe Wechselwirkungen. Der so formierte Komplex wird in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Chloroform, mit Phospholipiden im gewünschten Verhältnis gemischt und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Dieses Gemisch ist, vorzugsweise in einer geschlossenen Ampulle, unter Schutzgas, z. B. Stickstoff, lange Zeit ohne Veränderung seiner Bestandteile lagerfähig. Zur Gewinnung von Liposomen wird der Ampulleninhalt mit Wasser oder einer geeigneten Menge Puffer, z. B. phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, intensiv geschüttelt. Die so gewonnene Liposomenpräparation wird dann ohne weitere Aufarbeitung appliziert. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren erreicht man im Gegensatz zu anderen liposomalen Einschlußverfahren quantitative Bindung des zu verkapselnden Wirkstoffes in Liposomen. Es gelingt die Gewinnung eines lagerfähigen Zwischenproduktes, aus dem in einfacher und schneller Weise beliebig applizierbare Liposomen gewinnbar sind.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird durch nachfolgende Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Eine Lösung von 1 g Phosphatidylcholin, 500 mg Cholesterol, 100 mg Dicethylphosphat und 50 mg Daunorubicin in Chloroform wird zur Trockene eingedunstet und der Trockenrückstand unter Schutzgas in Ampullen abgefüllt.

Zur Gewinnung der applikationsfähigen Liposomenemulsion wird der Ampulleninhalt mit 50 ml 0,01 M Trispuffer pH 7,4 intensiv geschüttelt. Zur Kontrolle des quantitativen Wirkstoffeinschlusses wird ein aliquoter Teil der Gelchromatographie an Sephadex G 50 unterzogen. Dabei erweist sich alles Daunorubicin als liposomal assoziiert.

Beispiel 2

Analog Beispiel 1, statt Dicethylphosphat jedoch Zusatz von 225 mg Phosphatidylserin.

Beispiel 3

Analog Beispiel 1, statt Dicethylphosphat jedoch Zusatz von 450 mg Cardiolipin.

Beispiel 4

Eine Lösung von 1 g Phosphatidylcholin, 500 mg Cholesterol, 170 mg Stearvlamin und 32 mg Metotrexat (MTX) in Chloroform wird zur Trockene eingeeengt und der Trockenrückstand in Ampullen abgefüllt. Zur Gewinnung der applikationsfähigen Liposomenemulsion wird der Ampulleninhalt mit 17 ml 5 mM Phosphatpuffer pH 7,4 intensiv geschüttelt. Zur Kontrolle des quantitativen Wirkstoffeinschlusses wird ein aliquoter Teil der Gelchromatographie an Sephadex G 50 unterzogen. Dabei erweist sich alles MTX als liposomal assoziiert.

Bei der therapeutischen Testung an tumortragenden Mäusen (L 1210 i. v., Behandlung einmal am 1. Tag i. p.) entsprechen die nach Beispiel 1-4 hergestellten Liposomen hinsichtlich therapeutischer Effektivität (Verlängerung der Lebenszeit) und Nebenwirkungen (Leukozytenminimalwert) Liposomenpräparationen, die nach üblicher Weise, z. B. durch Beschallung und anschließende Trennoperationen, hergestellt wurden.