



(12) **Ausschließungspatent**

(11) **DD 290 809 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 37/22
A 61 K 9/48

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD A 61 K / 332 353 3	(22)	05.09.89	(44)	13.06.91
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72)	Arndt, Dietrich, Dr. sc. nat.; Zeisig, Reinhard, Dr. rer. nat.; Fichtner, Iduna, Dr. sc. nat., DE
(73)	Zentralinstitut für Krebsforschung, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin, DE
(74)	siehe (73)

(54) **Verfahren zur Herstellung liposomenbildender Zusammensetzungen**

(55) Liposomen; liposomenbildende Amphiphile; hydrophile Steranderivate; Einschlußausbeute; Stabilität des Einschlusses; Wirkstoffverkapselung; optimale Vesikelgröße

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen aus neuartigen Amphiphilen, die keine Phospholipide sind und sich von natürlichen, körpereigenen Produkten ableiten. Die erfindungsgemäß aus einem neuartigen hydrophilen Steranderivat hergestellten Liposomen zeichnen sich durch hohe Einschlußausbeuten, hohe Stabilität hinsichtlich des Austritts eingeschlossenen Wirkstoffs und die Tatsache aus, daß sie leicht in einer für die parenterale Anwendung besonderes geeigneten Größen hergestellt werden können.

Aufgrund dieser Vorteile wurden eine große Zahl biologisch aktiver Verbindungen in Liposomen eingeschlossen. Zu Übersichten vergleiche Gregoriadis, G. (Herausgeber) *Liposome Technology*, I–III, CRC Press 1984; Arndt, D., Fichtner, I.: *Liposomen, Darstellung, Eigenschaften, Anwendung*, Akademie-Verlag 1986; Gregoriadis, G. (Herausgeber) *Liposomes as drug carriers – recent trends and progress*, John Wiley & Sons 1988. Bei vielen Liposomenpräparationen sind Phospholipide der vesikelbildende Anteil. Im DDR-Patent 239 117 der Ciba-Geigy AG werden pharmazeutische Zubereitungen auf Liposomenbasis mit synthetischen Phospholipiden als Lipidkomponenten beschrieben. Vielfach dienen auch aus Naturstoffen isolierte Phospho- oder Sphingolipide als Liposomenbildner. Daneben sind eine große Zahl von Amphiphilen, die keine Phospholipide sind, zur Vesikelbildung befähigt. Zu einer Übersicht bei besonderer Berücksichtigung der Patentsituation vgl. Schenk et al., *Pharmazie* 43 (1988) 457–463. Insbesondere bei der Verwendung von Phospholipiden als liposomenbildender Anteil hat sich der Einbau von Cholesterol in der Lipiddoppelschicht bewährt. Der Zusatz des Steroids erhöht u. a. die Liposomenstabilität in biologischen Flüssigkeiten, insbesondere im Blut. Durch Einführung hydrophiler Gruppierungen in das Cholesterolmolekül hat man Verbindungen erhalten, die ohne weitere Zusätze zur Vesikelbildung befähigt sind. Im US-amerikanischen Patent 4544 545 werden Vesikelbildner in Form von Estern aliphatischer Carbonsäuren mit Cholesterol beschrieben. Doppelschichtstrukturen werden auch bei der Hydratation von Triethoxycholesterol erhalten (Patel et al., *Biochim. Biophys. Acta* 797 (1984) 20–26. Ein Nachteil des Triethoxyderivats ist, daß aus ihm mit den üblichen Methoden (Beschallung usw.) keine kleineren, unilamellaren Vesikel hergestellt werden können.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines sich vom Cholesterol ableitenden zur Vesikelbildung befähigten Amphiphils. Die sich aus dem Amphiphil ableitenden Liposomen sollen hohe Einschlußkapazität und hohe Stabilität hinsichtlich des Austritts eingeschlossenen Wirkstoffs aufweisen und in allen üblichen Liposomentypen (MLV, REV, SUV), insbesondere SUV verfügbar sein.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, pharmazeutische Zusammensetzungen aus Amphiphilen der Formel I, die keine Phospholipide sind und sich von natürlichen, körpereigenen Produkten ableiten, herzustellen. Die erfindungsgemäß aus dem bisher noch nicht beschriebenen Amphiphil hergestellten Liposomen zeichnen sich durch hohe Einschlußausbeuten, hohe Stabilität hinsichtlich des Austritts eingeschlossenen Wirkstoffs und die Tatsache aus, daß sie leicht in einer für die parenterale Anwendung besonders geeigneten Größe hergestellt werden können. Erfindungsgemäß wird das zur Herstellung von Liposomen geeignete Amphiphil der Formel I synthetisiert, indem ausgehend vom 3-Toluensulfonat des Cholesterols dieses mit Diethylenglykoll in einem cyclischen Ether, vorzugsweise Dioxan oder Tetrahydrofuran zum 2[2(3 β -Cholest-5-en-3yl)oxy]-ethoxy-ethanol (Diethoxycholesterol) Formel I umgesetzt. Zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen wird das Diethoxycholesterol für sich allein oder in Gegenwart eines weiteren, ggf. geladenen Amphiphils zusammen mit dem einzuschließenden Wirkstoff in einem geeigneten Puffer hydratisiert.

Im Gegensatz zu aus anderen 3-substituierten Cholesterolderivaten hergestellten Vesikeln lassen sich die erfindungsgemäß hergestellten Liposomen nach an für sich bekannten Verfahren (Beschallung, Extrusion) in kleine, einschichtige Vesikel (SUV) überführen (Durchmesser 30–100 nm).

Die nachfolgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung ohne sie zu beschränken. Temperaturangaben erfolgen in Grad Celsius.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Zu einer Lösung von 1,0 g (1,85 mmol) Cholesteryl-p-toluensulfonat (Wallis et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 59 [1937] 137–140) in 18 ml trockenem Dioxan werden 7,5 ml wasserfreies Diethylenglykoll gegeben und die Mischung 3 Stunden unter Stickstoff am Rückfluß erhitzt.

Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand in 15 ml Wasser aufgenommen und die Wasserphase mehrfach mit Ether extrahiert. Nach Abdestillieren des Extraktionsmittels wird aus dem Rückstand durch Säulenchromatographie (200 g Kieselgel 60, Merck, Laufmittel Chloroform) das Diethoxycholesterol (Formel I) rein dargestellt.

-Ausbeute:	0,62 g Diethoxycholesterol = 70 % d. Th.
Massenspektrum:	M ⁺ 474
IR-Spektrum	D _{OH} 3445 cm ⁻¹
	D _{C=O} 1660 cm ⁻¹
	D _{C-O} 1120 cm ⁻¹

Zur Herstellung von Liposomen wird in einem Rundkolben aus einer Lösung von 50 mg Diethoxycholesterol, (Formel I) das Lösungsmittel abdestilliert und der erhaltene Lipidfilm mit einer Lösung von 6-Carboxyfluorescein (200 $\frac{\mu\text{Mol}}{\text{l}}$) in 3,5 ml

Calcium-freier, Phosphat-gepufferter (pH 7,2–7,4) Kochsalzlösung (PES) bei 40°C auf einem Laborschüttler 15 Stunden lang geschüttelt.

Der nicht liposomal eingeschlossene Anteil des Fluoreszenzmarkers wird durch Dialyse (Visking-Dialyse-Schlauch, 24 h, gegen PBS) entfernt. Einschlußkapazität 4,5%, 6-Carboxyfluoresceinfreisetzungsrate (25 Tage) <10%, zur Methodik vgl. Nuhn et al., *Pharmazie* 40 [1985] 705–709).

Beispiel 2

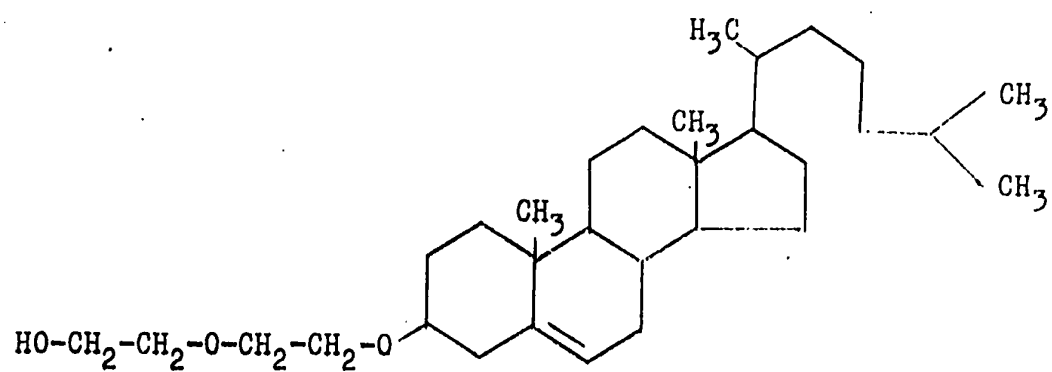
Der aus 50 mg Diethoxycholesterol (Formel I), Herstellung wie in Beispiel 1, durch Abdestillieren des Lösungsmittels Cyclohexan in einer Gefriertrocknungsanlage erhaltene Rückstand wird mit einer Lösung von 6-Carboxyfluorescein ($200 \mu\text{Mol/l}$) in 3,5 ml Calcium-freier, Phosphat-gepufferter ($\text{pH } 7,2-7,4$) Kochsalzlösung (PBS) bei 40°C auf einem Laborschüttler 15 Stunden lang geschüttelt. Anschließend wird die entstandene Dispersion multischichtigen Liposomen bei $40-45^\circ\text{C}$ in einem Gefäß intermittierend (gleiche Puls- und Pausenzeiten) bei 20 KHz solange beschallt bis ein Trübungswert $< 0,1$ erreicht ist. Nicht eingeschlossenes 6-Carboxyfluorescein wird durch Gelchromatographie an Sephadex G-50 abgetrennt. Einschlußkapazität 1,6%, 6-Carboxyfluoresceinfreisetzungsrates (25 Tage) $< 14\%$, vgl. Beispiel 1. Bestimmung der Liposomengröße (elektronenmikroskopisch) $50-120 \text{ nm}$.

Beispiel 3

Der aus 250 mg Diethoxycholesterol (Formel I), Herstellung wie in Beispiel 1 und 78 mg Dicetylphosphat (Dihexadecylhydrogenphosphat), reinst (Serva) durch Abdestillieren des Lösungsmittels Cyclohexan in einer Gefriertrocknungsanlage erhaltene Rückstand wird mit einer Lösung von 17 mg Mitoxantron in 20 ml steriler, Calcium-freier, Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) dispergiert. Die entstandene Dispersion multischichtiger Liposomen wird bei $40-45^\circ\text{C}$ in einem Gefäß intermittierend (gleiche Puls- und Pausenzeiten) bei 20 KHz solange beschallt bis ein Trübungswert $< 0,1$ erreicht ist. Nach 30minütigem Stehen wird bei 5°C und 10^5 g eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wird vom Pellet abdekantiert und durch Sterilfiltration (Membranfilter 0,8; 0,45 und $0,2 \mu\text{m}$) keimfrei gemacht. Eine Trennung eines Aliquots an Sephadex G-50 zeigt, daß alles Mitoxantron liposomal gebunden ist. Die erhaltene Liposomendispersion ist bei 4°C lagerfähig und eignet sich zur parenteralen (i. v.) Applikation.

290 809

4



I