

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. August 2003 (28.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/070220 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07D 233/64, 295/088, 295/13

A61K 9/127,

(74) Anwälte: SCHNEIDER, Henry usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstr. 15-17, 10117 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/01661

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Februar 2003 (19.02.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 07 177.2 19. Februar 2002 (19.02.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, RO, SC, SG, TN, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NOVOSOM AG [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ESSLER, Frank [DE/DE]; August-Bebel-Strasse 41, 06108 Halle (DE). PANZNER, Steffen [DE/DE]; Blumenstrasse 9, 06108 Halle (DE). ENDERT, Gerold [DE/DE]; Seebener Strasse 20, 06114 Halle (DE).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



A1

(54) Title: PH-SENSITIVE CATIONIC LIPIDS, AND LIPOSOMES AND NANOCAPSULES CONTAINING THE SAME

WO 03/070220

(54) Bezeichnung: PH SENSITIV KATIONISCHE LIPIDE, LIPSONEN UND NANOKAPSELN, DIE DIESE UMFASSEN

(57) Abstract: The invention relates to a pH-sensitive cationic lipid having a pKa value between 3,5 and 8 according to general formula cation-spacer-Y-spacer-X-lipid wherein Y and X represent linking groups. The cations are heterocycles containing nitrogen, especially imidazole and morpholine. The invention also relates to liposomes containing said optionally cationic lipids.

WO 03/070220

(57) Zusammenfassung: Es wird ein pH-sensitives kationisches Lipid mit einem pKa-Wert zwischen 3,5 und 8 nach der allgemeinen Formel Kation- Spacer- Y- Spacer - X- Lipid vorgeschlagen, wobei Y und X verbindende Gruppen darstellen. Die Kationen sind dabei stickstoffhaltige Heterozyklen, insbesondere Imidazol und Morpholin. Es werden weiterhin Liposomen beschrieben, die diese fakultativ kationischen Lipide enthalten.

pH-SENSITIV KATIONISCHE LIPIDE, LIPOSOMEN UND NANOKAPSEIN, DIE DIESE UMFASSEN

5

Die Erfindung betrifft pH-sensitive, kationische Lipide, d.h. polare Verbindungen auf Basis amphiphiler Moleküle, 10 wobei an deren hydrophile Kopfgruppe ein oder mehrere organische Kationen mit einem pK-Wert zwischen 3,5 und 8 substituiert sind; die Erfindung betrifft weiterhin Liposomen und Nanokapseln, die diese Verbindungen enthalten und die Verwendung dieser Liposomen.

15

Unter dem Begriff der Lipide werden drei Klassen von Naturstoffen zusammengefasst, die sich aus biologischen Membranen isolieren lassen: Phospholipide, Sphingolipide und Cholesterol mit seinen Derivaten. Technisch hergestellte Verbindungen mit ähnlichen Eigenschaften sind z.B. die Diacylglyceride oder N, N-Dialkylamine.

Von technischem Interesse sind diese Substanzen bei der Herstellung von Liposomen. Diese Liposomen lassen sich 25 unter anderem als Container für Wirkstoffe bei pharmazeutischen Zubereitungen einsetzen. Wünschenswert ist dabei eine effiziente und stabile Verpackung des Cargos und eine kontrollierbare Freisetzung des Inhalts. Beide Ansprüche sind nicht ohne weiteres zu vereinen: Je stabiler 30 und dichter die Verpackung ist, desto schwerer gibt sie den eingeschlossenen Wirkstoff wieder frei. Aus diesem Grund wurden Liposomen entwickelt, die ihre Eigenschaften als Reaktion auf einen äußeren Reiz, wie z.B. die Konzentration, die Temperatur oder den pH-Wert, verändern. 35 Im Stand der Technik sind verschiedene thermosensible und

pH-sensitive Liposomen bekannt. Die pH-sensitiven Liposomen sind von besonderem Interesse, da dieser Parameter sich auch unter physiologischen Umständen, etwa bei der endozytotischen Aufnahme eines Liposoms in Zellen oder bei 5 der Passage des Magen-Darm-Trakts, ändern kann.

Im Weiteren sollen folgende Abkürzungen verwendet werden:

10 CHEMS Cholesterolhemisuccinat,
PC Phosphatidylcholin,
PE Phosphatidylethanolamin und
PS Phosphatidylserin.

15 Bekannte pH-sensitive Liposomen umfassen insbesondere CHEMS. CHEMS wird u.a. in Mischung mit Phosphatidylethanolamin zur Herstellung pH-sensitiver Liposomen verwendet (Tachibana et al. (1998); BBRC 251: 538-544, US4891208). Solche Liposomen können von Zellen endozytiert werden und vermögen auf diesem Weg 20 Cargomoleküle in das Innere von Zellen zu transportieren, ohne die Integrität der zellulären Membran zu verletzen.

25 Ein wesentlicher Nachteil des CHEMS ist dessen anionischer Charakter. Die damit hergestellten Liposomen besitzen eine negative Gesamtladung und werden nachteiligerweise nur mit geringer Effizienz von Zellen aufgenommen. Trotz des oben beschriebenen Transfermechanismus eignen sie sich daher kaum für den Eintransport von Makromolekülen in Zellen.

30 Für diesen Zweck werden fachgemäß kationische Liposomen verwendet, die über eine möglichst hohe und konstante Oberflächenladung verfügen. Die positive Gesamtladung solcher Partikel führt zu einer elektrostatischen Anheftung an Zellen und in der Folge zu einem effizienten 35 Eintransport. Der Einsatz dieser Verbindungen und der damit

hergestellten Liposomen bleibt aber auf Anwendungen *in vitro* oder *ex vivo* beschränkt, da solche positiv geladenen Liposomen mit Serumbestandteilen nachteilig unkontrollierte Aggregate bilden.

5

Die Nachteile der bekannten Lipide und der Strukturen, die aus diesen Lipiden gebildet werden, lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Menge an Proteinen oder DNA beziehungsweise RNA, die in anionische Liposomen 10 eingeschlossen werden kann, ist in der Regel unterdurchschnittlich und reicht für verschiedenste Anwendungen nicht aus. Durch Verwendung von bekannten kationischen Liposomen kann eine geeignete Menge an Proteinen beziehungsweise Nukleinsäuren oder deren Derivate 15 eingeschlossen werden, aber diese Strukturen besitzen oft eine kritische Zytotoxizität. Membranen, in die zur Erhöhung ihrer fusogenen Eigenschaften ein hoher Anteil an Phosphatidylethanolamin eingeschlossen ist, weisen jedoch eine geringe Stabilität auf. Demgemäß haben die bekannten 20 Liposomen den Nachteil, dass sie

- (a) entweder instabil sind,
- (b) zu wenig Material in ihrem Inneren transportieren oder
- (c) eine zu hohe Zytotoxizität besitzen

25

Sofern angestrebt wird, derartige nachteilige Eigenschaften zu verbessern, geht dies häufig mit einer erhöhten Zytotoxizität und mit einer Inkompatibilität mit Serum oder Blut einher. Einzelne bekannte Lipide und die sie 30 umfassenden Liposomen, müssen nicht alle diese Nachteile aufweisen, jedoch sind keine Strukturen bekannt, die möglichst viele, d.h. mindestens zwei, bevorzugt drei oder besonders bevorzugt mehrere der genannten Nachteile nicht aufweisen.

35

Aufgabe der Erfindung war es daher, einfach und preiswert herzustellende, neue Verbindungen bereitzustellen, die die genannten Nachteile nicht aufweisen und

- 5 i) mit deren Hilfe Wirkstoffe in Liposomen stabil eingeschlossen werden können,
- ii) mit deren Hilfe Liposomen hergestellt werden können, die einen eingeschlossenen Wirkstoff in das Innere von Zellen transportieren können,
- 10 iii) durch deren Anwesenheit die Herstellung von kationischen Liposomen gelingt, die ohne Bildung von größeren Aggregaten mit Serum gemischt werden können,
- iv) die in hohem Anteil in liposomale Membranen eingebaut werden können und
- 15 v) die über eine gute biologische Abbaubarkeit bei hinreichender biologischer Stabilität verfügen.

20 Die Erfindung löst diese technische Aufgabe durch Bereitstellung eines pH-sensitiven, kationischen Lipids mit einem pKa-Wert zwischen 3,5 und 8 nach der allgemeinen Formel (I) :

25 (I) Kation - Spacer 2 - Y - Spacer 1 - Amphiphil

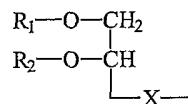
wobei

- 30 (a) das Kation aus der Gruppe umfassend Imidazol, Morpholin, Piperazin, Purin, Pyridin und/oder Pyrimidin oder einem Derivat hiervon ausgewählt ist,
- (b) die Spacer 1 und/oder Spacer 2 Niederalkylreste mit bis zu 8 C-Atomen mit linearer, verzweigter oder ringförmiger Struktur und 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind,

(c) Y eine Deletion; $-(C=O)-O-$; $-(C=O)-NH-$; $-NH-(C=O)-O-$; $-O-$; $-NH-$; $-CH=N-$; $-O-(O=C)-$; $-S-$; $(O=C)-$; $-NH-(O=C)-$; $-O-(O=C)-NH-$; $-N=CH-$ und /oder $-S-S-$ umfasst,

5 (d) das Amphiphil eine Struktur nach der allgemeinen Formel (II) oder (III) umfasst:

(II)



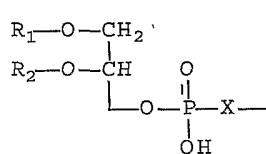
10

wobei

R1 und R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Alkyl oder Acylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind und X ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend eine Deletion; $-O-(C=O)$; $-NH-(C=O)-$; $-S-(C=O)-$; $-O-$; $-NH-$; $-S-$; $-N=CH-$; $-(O=C)-O-$; $-S-(O=C)-$; $-NH-(O=C)-$; $-N=CH-$ und /oder $-S-S-$,

20

(III)



25

wobei

R1 und R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Acylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigte Bindungen sind und X $-O-$ ist.

30

Die einzelnen Bausteine sollen im Folgenden erläutert werden:

Amphiphile

Das Amphiphil umfasst sowohl membranbildende als auch membranständige Verbindungen einer Bilayermembran. Bevorzugte Bausteine der erfindungsgemäßen Verbindungen 5 sind Amphiphile wie Diacylglyceride, Dialkylglyceride, Phosphoglyceride, acylierte oder alkylierte 3-Amino-1,2-Propandiole, da diese Verbindungen insbesondere billig verfügbar sind, eine einfache Chemie aufweisen und in einem hohen Anteil in Membranen eingebaut werden können, ohne 10 deren Permeabilität zu erhöhen oder gar den Membrancharakter zu zerstören, bevorzugt völlig zu zerstören.

Weiterhin bevorzugt sind die **Amphiphile**: Diacylglycerole, 15 Dialkylglycerole, Phosphoglycerole, acylierte oder alkylierte 3-Amino-1,2-Propandiole. Die in diesen Fragmenten vorhandenen langkettigen Alkyle oder Acyle umfassen zwischen 8 und 30 C-Atome. Sie sind vorzugsweise geradkettig oder wenig verzweigt und können 0, 1 oder 2 20 ethylenisch ungesättigte Bindungen aufweisen. Besonders bevorzugt sind solche Substituenten, die man in natürlichen Lipiden findet, also geradkettige Fettsäuren oder Fettalkohole mit 12 bis 20 C-Atomen und keiner, einer oder zwei ungesättigten Bindungen. Ganz besonders bevorzugt sind 25 Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearoyl-, Oleoyl- und Linoyl-reste, sowie deren entsprechende Alkohole. Für die N, N-Dialkylamine gilt das sinngemäß für deren langkettige Alkylreste.

30 Besonders bevorzugt ist es, dass Dicarbonsäuren als polare Kopfgruppe des Amphiphils eingesetzt werden, die insbesondere eine Ankopplung der letztlich ladungstragenden Substituenten über weitere funktionelle Gruppen erlauben. Bevorzugt sind die folgenden, daraus abgeleiteten 35 Amphiphile: langkettige Ester von 1,4- oder 1,5-

Dicarbonsäuren, insbesondere Asparaginsäure, Glutaminsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Citronensäure, Aconitsäure, Citraconsäure, Maleinsäure oder ähnliche solcher Verbindungen, bei denen die letztlich ladungstragenden 5 Substituenten über die verbleibende Aminogruppe, Hydroxylgruppe, Carboxylgruppe oder über die Doppelbindung gekoppelt sind.

Andere vorteilhafte Amphiphile erhält man aus Diaminen mit 10 einer weiteren funktionellen Gruppe, etwa als Diamid des 3-Aminoalanins, der Diaminobuttersäure, des Ornithins oder Lysins mit langkettigen Fettsäuren.

Letztlich lassen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen 15 auch als Derivate des Sphingosins oder der Ceramide herstellen. Sie sind auch als Derivate langkettiger Vinylether oder Plasmalogene darstellbar.

Die mit Vorteil als Ausgangsstoff verwendeten Amphiphile 20 können an ihrer hydrophilen Kopfgruppe verschieden funktionalisiert sein, um zweckmäßigerweise eine einfache und beständige Ankopplung zu erlauben oder optional die Funktion eines räumlichen Spacers zu erfüllen. Besonders geeignet für eine direkte Kopplung sind die Hydroxylgruppe, 25 die Aminogruppe oder auch Carboxylgruppen. Diese Kopplungsgruppen sind vorteilhafterweise gut biologisch abbaubar.

Y und **X** stellen verbindende funktionelle Gruppen dar, deren 30 Anwesenheit nicht in jedem Falle zwingend ist; es kann vorgesehen sein, dass der Wert für **Y** und/oder **X** eine Deletion ist, d.h. diese funktionellen Gruppen fehlen. Bevorzugt umfasst die verbindende Gruppe **X** die Struktur - (C=O) -O-; - (C=O) -NH-; - NH- (C=O) -O-; - O-; - NH-; - CH=N- oder 35 - S-S-. Vorteilhafterweise entspricht die verbindende Gruppe

Y in ihrer Struktur der Gruppe X, zusätzlich kann sie die Struktur -O-(O=C)-; -S-; -(O=C)-; -NH-(O=C)-; -O-(O=C)-NH- oder -N=CH- umfassen. Die Gruppe Y kann beispielsweise entfallen, wenn sich das Kation direkt an das Amphiphil 5 koppeln lässt, beispielsweise bei der Veresterung von Imidazolessigsäure mit Dipalmitoylglycerol.

Spacer: Zwischen dem Kation und dem Amphiphil liegen gegebenenfalls die Molekülbausteine: Spacer - Y - Spacer - X. Der Spacer ist ein Niederalkylrest mit linearer, verzweigter oder ringförmiger Struktur, der 0 bis 8 C-Atome besitzt und 0, 1 oder 2 ethylenische ungesättigte Bindungen enthält, bevorzugt -CH₂-; -CH₂-CH₂- und/oder -CH₂-CH₂-CH₂- . Der Spacer kann zur Erhöhung der Polarität des Moleküls 15 Hydroxylgruppen besitzen. Der Spacer kann insbesondere ein Zucker sein. Der Spacer kann weiterhin vorteilhafterweise auch ein Polyethylenglykol sein, wobei solch ein Spacer bis zu 20 Monomereinheiten umfassen kann.

20 **Kation:** Das Gesamt molekül erhält seine pH-abhängige Ladungscharakteristik durch ein oder mehrere organische Kationen mit einem pKa-Wert zwischen 3,5 und 8. Bevorzugte Moleküle oder Molekülbausteine mit dieser Eigenschaft sind Stickstoffbasen. Diese Stickstoffbasen werden über Spacer und Kopplungsgruppen mit dem Lipid verknüpft, so dass eine 25 Verbindung nach der erfindungsgemäßen Formel entsteht.

Durch Ankopplungsreaktionen entstehen amphiphile organische Kationen, die beispielsweise aus den folgenden Stoffklassen 30 stammen:

o-, m-, p-Aniline; 2-,3- oder 4-substituierte Anisidine, Toluidine oder Phenetidine; 2-, 3-, 5-,6-, 7- oder 8- substituierte Benzimidazole, 2-, 3, 4- oder 5-substituierte 35 Imidazole, 1-, oder 5-substituierte Isochinoline, 2-,3-

oder 4- substituierte Morpholine, 2-, 3- oder 4- substituierte Picoline, 1-, 2-, oder 3- substituierte Piperazine, 2-, 5- oder 6-modifizierte Pterine, 3-, 4-, 5-, 6- oder 9-substituierte Purine, 2- oder 3- substituierte 5 Pyrazine, 3- oder 4- substituierte Pyridazine, 2-, 3- oder 4- substituierte Pyridine, 2-, 4-, 5- oder 6-substituierte Pyrimidine, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- oder 8- substituierte Chinoline, 2-, 4- oder 5- substituierte Thiazole, 2-, 4- oder 6- substituierte Triazine, oder auch Derivate des 10 Tyrosins. Besonders bevorzugt sind Piperazine, Imidazole, Morpholine, Purine und/oder Pyrimidine.

In vielen Fällen, etwa wenn die Stickstoffbasen als 15 Ringsysteme vorliegen, existieren Stellungsisomere, bei denen der verbindende Spacer an verschiedenen Positionen des organischen Kations substituiert ist. Solche Stellungsisomere fallen unter den Offenbarungsgehalt dieser Erfindung. Durch die Stellungsisomerie allein lassen sich in vielen Fällen bereits die pKa-Werte der organischen 20 Kationen beeinflussen. Die dem zugrunde liegenden Regeln sind dem Fachmann geläufig. Alternativ können diese Einflüsse aus Tabellenwerken abgeschätzt werden (Handbook of Chemistry and Physics, 73. Band, S. 8-37 ff.). Bevorzugt sind R1 und/oder R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Alkyl 25 oder Alkylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen, insbesondere Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, Stearoyl-, Oleoyl- und Linoyl-Reste, oder deren entsprechende Alkohole. Dem Fachmann ist bekannt, dass er neben den bevorzugten Amphiphilen, Y, X, R1, R2, Spacer 30 und/oder Kationen auch weitere Amphiphile, Y, X, R1, R2 Spacer und/oder Kationen einsetzen kann; in einem solchen Falle sind die bevorzugten Amphiphile Y, X, R1, R2, Spacer und/oder Kationen kein essenzieller Bestandteil der erfindungsgemäßen Strukturen. Weiterhin kann es vorteilhaft 35 sein, auf den Spacer, Y und/oder X zu verzichten.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung weist die Verbindung einen pKa-Wert zwischen 3,5 und 7, bevorzugt zwischen 4 und 6,5 auf. Dieser pKa-Wert liegt 5 vorteilhafterweise in einem Bereich, der für die Physiologie zahlreicher Organismen eine entscheidende Bedeutung besitzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante der 10 Erfindung sind die Kationen Derivate aus Piperazinen, Imidazolen, Morpholinen, Purinen und/oder Pyrimidinen.

Ganz besonders bevorzugt sind solche Molekülfragmente, wie 15 sie in biologischen Systemen vorkommen, insbesondere 4-Imidazole (Histamine), 2-, 6- oder 9- Purine (Adenine, Guanine, Adenosine oder Guanosine), 1-, 2- oder 4-Pyrimidine (Uracile, Thymine, Cytosine, Uridine, Thymidine, Cytidine) oder auch Pyridin-3-carbonsäuren (Nicotinsäureester oder -amide).

20 Die hier genannten Strukturfragmente können selbstverständlich weitere Substituenten aufweisen. Das können beispielsweise Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Isopropylreste sein, besonders bevorzugt in hydroxylierter Form mit einer oder zwei Hydroxylgruppen. Das können aber auch Hydroxyl- oder Ketofunktionen des Ringsystems sein.

Daneben sind weitere Strukturfragmente möglich, insofern 30 sie im pH-Bereich zwischen 3,5 und 8,5 keine anionisch dissozierten Molekülteile bilden, wie beispielsweise Carbonsäuren, Sulfonsäuren oder manche aromatische Hydroxylgruppen oder Enole.

Stickstoffbasen mit bevorzugten pKa-Werten entstehen auch 35 durch einfache oder mehrfache Substitution des

- Stickstoffatoms mit Niederalkanhydroxylen, etwa Hydroxymethyl- oder Hydroxyethylgruppen. Geeignete organische Basen aus dieser Gruppe sind beispielsweise Aminopropandiole, Triethanolamine, Tris- (hydroxymethyl)methylamine, Bis- (hydroxymethyl) methylamine, Tris- (hydroxyethyl)methylamine, Bis- (hydroxyethyl)methylamine oder die entsprechend substituierten Ethylamine.
- Stickstoffbasen mit bevorzugten pKa-Werten sind auch unter den Aminozuckern oder Aminozuckeralkoholen zu finden. Die Ankopplung dieser Fragmente an den hydrophoben Molekülteil kann entweder über den Stickstoff der Base erfolgen oder über eine der Hydroxylfunktionen.
- Neben den Derivaten mit einem einzelnen organischen Kation werden auch solche mit zwei oder drei gleichen oder verschiedenen dieser Gruppen bevorzugt. Dabei müssen alle Gruppen einen pKa-Wert im genannten Bereich besitzen. Eine geeignete komplexe Gruppe ist das Amid aus Histamin und Histidin oder aus Histamin und Histindinylhistidin.
- Anionische Gruppen wie etwa Carbonsäuren, Sulfonsäuren, Enole oder aromatische Hydroxyle dürfen nur dann Bestandteil des Moleküls sein, wenn sie im beanspruchten pH-Bereich zwischen 3,5 und 8,5 nicht dissoziiert vorliegen. Das ist im Allgemeinen der Fall, wenn deren pKa-Wert oberhalb von 9,5 liegt.
- In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Amphiphil ausgewählt aus



mit R1 und R2 sind unabhängig voneinander C8 bis C30 Alkyl mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen,

5 X ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Deletion; -O-; -NH- und/oder -S-;.

10 **Synthesemethoden:** Methoden zur chemischen Kopplung der einzelnen Molekülbausteine sind dem Fachmann bekannt und können je nach verwendetem Ausgangsstoff und Kopplungskomponente variieren. Typische Reaktionen sind die Veresterung, die Amidierung, die Addition von Aminen an Doppelbindungen, die Veretherung oder auch die reduktive Aminierung.

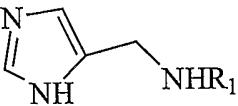
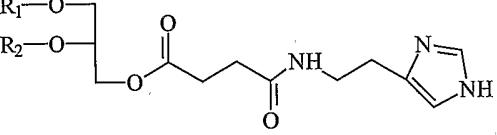
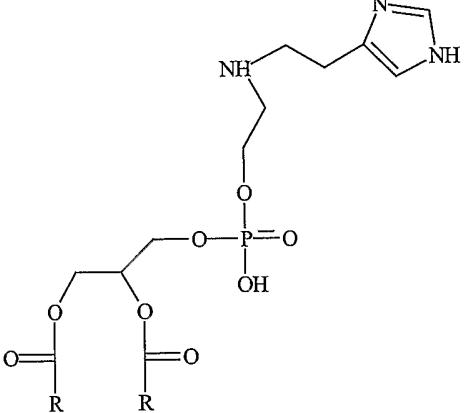
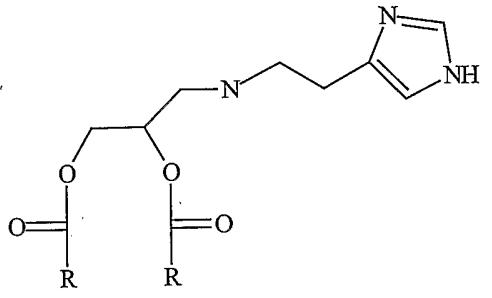
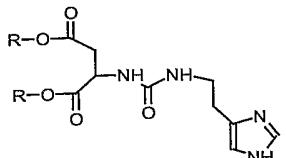
15 Besonders bevorzugte Moleküle lassen sich herstellen durch

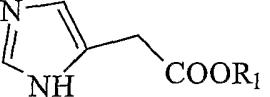
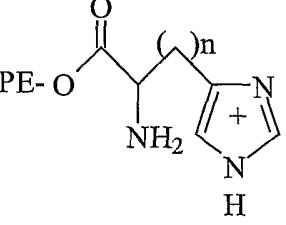
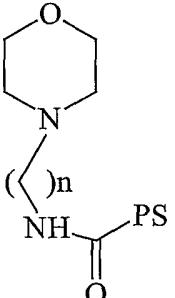
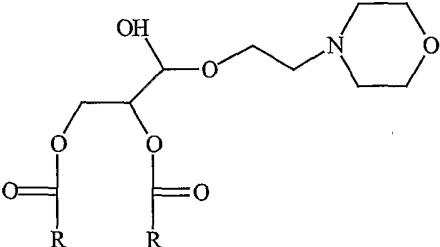
- i) Veresterung von Diacylglycerolen,
- ii) Veresterung oder Amidierung von Diacylglycerolhemisuccinat,
- 20 iii) Addition von Aminen an die Doppelbindung eines Diacylglycerolhemimaleats,
- iv) Amidierung von Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin,
- 25 v) Amidierung oder Alkylierung von 3-Amino-1,2-propandioldiestern,
- vi) Oxidation von Phosphatidylglycerolen und anschließende reduktive Aminierung und
- 30 vii) Reduktive Aminierung von Glyceraldehyd und anschließende Acylierung.

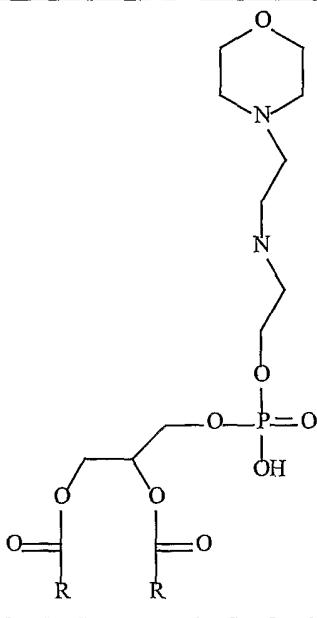
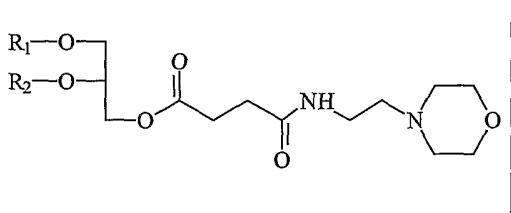
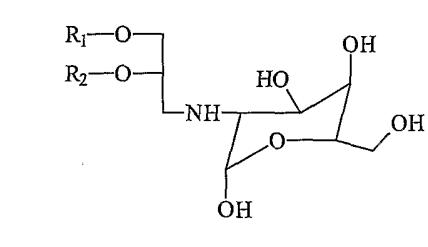
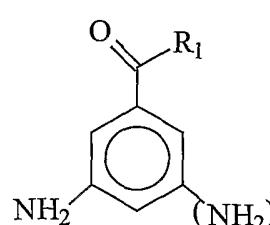
Zu den mit oben stehenden Methoden synthetisch zugänglichen besonders bevorzugten Verbindungen gehören die Folgenden (Tabelle 1), wobei R1 das Amphiphil bedeuten und ()_n

weitere Molekülteile im Sinne des oben definierten Spacers darstellen:

Tabelle 1

	<p>Histamin-Derivate. Bevorzugt erfolgt die Ankopplung eines Amphiphils, welches über eine freie Carboxyfunktion verfügt als Amid. Weiterhin bevorzugt ist die Amidierung von Phosphatidylserin.</p>
	<p>#59 Konjugation von Histamin an Dipalmitoylglycerolsuccinat. Die Reste R1 und R2 sind Acyl-, Alkyl- oder Alkenylgruppen.</p>
	<p>#30 Derivate des Phosphatidylglycerols. Die Ankopplung erfolgt mit Vorteil nach der Oxidation des endständigen Glycerols zum Aldehyd und anschließender reduktiver Kopplung des Amphoters, hier im Beispiel mit Histamin. Die Reste R sind Alkyl- oder Alkenylgruppen.</p>
	<p>Konjugation von beispielsweise Histamin an Glycerinaldehyd und anschließende Acylierung. Die Reste R sind Alkyl- oder Alkenylgruppen.</p>
	<p>N- (Aspartyldihydroxyalkyl) -N' - histaminy1-harnstoff. Die Reste R sind Alkyl- oder Alkenylgruppen.</p>

	<p>Imidazolelessigsäure-Derivate. Bevorzugt kann hier das Amid mit 3-Amino-1,2-Propandiolen gebildet werden.</p>
	<p>Histidin-Derivate. Die nebenstehende bevorzugte Verbindung entsteht durch Amidbildung mit Phosphatidylethanolamin.</p>
	<p>Morpholin-Derivate. Die nebenstehende bevorzugte Verbindung entsteht durch Amidbindung mit dem Carboxyl des Phosphatidylserins. Andere bevorzugte Derivate können beispielsweise mit dem Carboxyl der Diacylglycerolhemisuccinate gebildet werden.</p>
	<p>Halbetal aus einem acylierten Glycerinaldehyd und 2-Hydroxymorpholin. Die Reste R sind Alkyl- oder Alkenylgruppen.</p>

	<p>Morpholinyl-Phosphatidylethanolamin. Beispielsweise zugänglich durch Oxidation von 3-Morpholino-1,2-propandiol und anschließende reduktive Aminierung mit Phosphatidylethanolamin. Die Reste R sind Alkyl- oder Alkenylgruppen.</p>
	<p>#60 Konjugation von 4-(2-Aminoethyl)-Morpholin an Dipalmitoylglycerolsuccinat. Die Reste R1 und R2 sind Acyl-, Alkyl- oder Alkenylgruppen.</p>
	<p>Aminozuckerderivat. Konjugation von beispielsweise Glucosamin an Glycerinaldehyd und anschließende Acylierung. Die Reste R sind Acyl-, Alkyl- oder Alkenylgruppen.</p>
	<p>Aminobenzoic acid oder Diaminobenzoic acid derivatives. Hier erfolgt die Ankopplung des Amphiphiles bevorzugt als Ester oder Amid der Benzoic acid. Das Lipid kann beispielsweise ein 3-Amino-1,2-Propandiol-derivative sein.</p>

Durch die Offenbarung der erfindungsgemäßen Lipide hat der Fachmann die Möglichkeit, durch Routineversuche weitere äquivalente Verbindungen bereitzustellen, die von der erfindungsgemäßen Lehre mit erfasst sind. Der Fachmann 5 erkennt auch, dass er die erfindungsgemäßen Lipide durch Additionen, Duplikationen, Substitutionen, Deletionen, Inversionen oder auch andere Verfahren modifizieren kann, um sie an bestimmte Anwendungen anzupassen.

10 Bei der Addition kann es sich beispielsweise darum handeln, dass den erfindungsgemäßen Lipiden ein weiteres Kation, ein weiterer Spacer, ein weiteres X, ein weiteres Y und/oder ein weiteres Amphiphil zugefügt werden; selbstverständlich kann es auch vorgesehen sein, dass einem erfindungsgemäßen Lipid mehrere weitere Kationen, Spacer, X, Y und/oder Amphiphile zugefügt werden. Weiterhin ist es möglich, dass einzelne Bereiche des Lipids oder das gesamte Lipid mindestens einmal dupliziert werden. Genauso ist dem Fachmann bekannt, dass er einzelne Bestandteile der 15 erfindungsgemäßen Lipide durch ähnlich wirkende Bestandteile austauschen kann.

Weiterhin ist es möglich, den Aufbau der erfindungsgemäßen Lipide so zu verändern, dass eine bestimmte Reihenfolge 20 innerhalb des Lipides oder innerhalb eines Teilbereiches des Lipides verändert wird, so dass beispielsweise das Kation direkt an das Amphiphil gebunden ist und über das X beziehungsweise das Y an das Amphiphil Spacer gebunden vorliegen, wobei derartige Verbindungen im Sinne der 25 Erfindung im Wesentlichen funktionsanalog zu den erfindungsgemäßen Lipiden sind. Außerdem ist es möglich, einen ganzen Bereich aus dem Lipid herauszunehmen und umgekehrt wieder einzubauen. Dem Chemiker ist bekannt, dass nahezu alle Modifikations- und Mutationsmöglichkeiten, die 30 es beispielsweise auf dem Gebiet der Peptid-

beziehungsweise Protein- oder Nukleinsäurechemie gibt, in analoger Weise auch im Bereich der Lipidchemie angewandt werden können.

5 Die Erfindung betrifft auch Liposomen, die die erfinderischen Substanzen umfassen. Alle erfindungsgemäßen Substanzen oder Verbindungen lassen sich mit Vorteil in einem hohen Anteil in liposomale Membranen einbauen und führen erst dann zu einer positiven Ladung des
10 Gesamtpartikels, wenn der pH-Wert des Mediums kleiner als (pKa+1) der erfindungsgemäßen Verbindungen ist.

In einer besonderen Ausführungsvariante der Erfindung beträgt der Anteil des pH-sensitiven kationischen Lipids
15 maximal 50 mol%, insbesondere 40 mol% und bevorzugt 30 mol%. Besonders bevorzugt sind Zusammensetzungen, die mindestens 5 mol%, bevorzugt 7 mol%, besonders bevorzugt 10 mol%, ganz besonders bevorzugt 15 mol%, höchstens aber 40 mol% der Verbindung enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind Zusammensetzungen, die mindestens 10 mol% und höchsten
20 30 mol% des pH-sensitiven kationischen Lipids enthalten.

Zweckmäßig ist weiterhin eine Ausführungsvariante, bei der die Liposomen insbesondere Phosphatidylcholin,
25 Phosphatidylethanolamin und/oder Diacylglycerol umfassen. Da Cholesterole selbst keine Liposomen ausbilden können, ist der Zusatz eines weiteren Lipids notwendig. Dieses Lipid kann insbesondere ein Phospholipid sein. Weitere Modifikationen des Liposoms sind selbstverständlich möglich. So ist insbesondere die Verwendung Polyethylenglykol-modifizierter Phospholipide oder analoger Verbindungen vorteilhaft.

Für die Herstellung amphoterer Liposomen können anionische
35 Lipide wie etwa Phosphatidylglycerol, Phosphatidylserin,

5 Phosphatidsäure oder CHEMS zugesetzt werden. Dabei darf der Anteil der anionischen Lipide den der pH-sensitiv kationischen nicht übersteigen; er muß vielmehr kleiner sein. Diese amphoteren Liposomen sind bei Applikationen in vivo besser verträglich, da sie keine Aggregate mit Serumkomponenten bilden.

10 In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung weisen die Liposomen eine mittlere Größe zwischen 50 und 1000 nm, insbesondere 50 und 500 nm, bevorzugt zwischen 50 und 300 nm und ganz besonders bevorzugt zwischen 60 und 130 nm auf.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante umfassen die Liposomen wasserlösliche Wirkstoffe. Die erfindungsgemäßen Liposomen sind insbesondere für die parenterale Anwendung geeignet. Sie können bevorzugt in der Krebstherapie und zur Therapie schwerer Infektionen verwendet werden. Liposomendispersionen können dazu injiziert, infundiert oder implantiert werden. Sie verteilen sich danach im Blut oder in der Lymphe oder geben 20 als Depot ihren Wirkstoff kontrolliert ab. Letzteres kann durch hochkonzentrierte Dispersionen erreicht werden, die als Gele vorliegen. Die Liposomen können auch für topische Anwendung auf der Haut eingesetzt werden. Sie können 25 insbesondere dazu beitragen, dass verschiedene Wirkstoffe besser in die Haut eindringen können oder besonders bevorzugt durch die Haut in den Körper gelangen können. Weiterhin ist es möglich, die Liposomen für den Gentransfer einzusetzen. Genetisches Material kann wegen seiner Größe 30 und Ladung meist nicht ohne Hilfsmittel in Zellen gelangen. Dazu bedarf es geeigneter Träger wie z.B. Liposomen oder Lipid-Komplexe. Diese sollen zusammen mit der DNA effizient und möglichst gezielt in die betroffenen Zellen aufgenommen werden.

Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen hergestellt werden, zeigen vorteilhafter Weise nur eine geringe unspezifische Bindung an Zelloberflächen.

5 Das ist insbesondere dann der Fall, wenn weitere anionische Lipide zu Herstellung verwendet werden. Diese geringe unspezifische Bindung ist eine wesentliche Voraussetzung für das Zustandekommen einer spezifischen Bindung an Zielzellen. Werden die beschriebenen Liposomen mit weiteren 10 Liganden versehen, so ist eine Zielsteuerung der Vehikel gegeben. Der Wirkstoff kann dann spezifisch an solchen Zellen oder Geweben angereichert werden, die pathologische Zustände aufweisen.

15 Eine wesentliche Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen liegt daher bei der Konstruktion von Vektoren für den Wirkstofftransfer in lebenden Organismen. Die Vektoren sind besonders geeignet für den Transport von therapeutischen Makromolekülen wie etwa Proteinen oder DNA, 20 die von sich aus nicht die Zellmembran überwinden können oder im Blutstrom schnell abgebaut werden.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung umfassen die Liposomen als Wirkstoff ein Protein, ein 25 Peptid, eine Kohlenhydratstruktur, eine DNA, eine RNA, ein antisense-Nukleotid und/oder ein Decoy-Nukleotid.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsvariante befinden sich mindestens 50 μ g, bevorzugt mehr als 80 μ g, besonders bevorzugt mehr als 100 μ g und ganz besonders bevorzugt mehr als 140 μ g des Wirkstoffes pro mg Lipid im Innern des Liposoms.

35 Die Erfindung betrifft auch Nanokapseln, die die erfindungsgemäßen Lipide und/oder die erfindungsgemäßen

Liposomen umfassen. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, liposomale Nanokapseln bereitzustellen, so offenbaren beispielsweise die WO 00/28972 und/oder die WO 01/64330 verschiedene Verfahren 5 zur Generierung von Nanokapseln, die in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung mit aufgenommen sind.

Die Erfindung betrifft auch die erfindungsgemäßen Lipide, 10 die erfindungsgemäßen Liposomen und/oder die erfindungsgemäßen Nanokapseln zur Verwendung als medizinischer Wirkstoff. Bevorzugt sind die therapeutisch wirksamen Verbindungen nicht auf spezifische Indikationen beschränkt. Durch die Offenbarung der erfindungsgemäßen 15 Lehre werden die erfindungsgemäßen Strukturen für eine Therapie bereitgestellt; d.h. sie umfasst demgemäß vorteilhafterweise jede beliebige spezifische Indikation.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der 20 Wirkstoff ein Wirkstoff zur Prophylaxe, Diagnose, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung insbesondere von Krankheiten. Selbstverständlich kann es vorgesehen sein, die Lipide, Liposomen und/oder Nanokapseln, die als Wirkstoff eingesetzt werden, mit einem zweiten Wirkstoff zu 25 beladen; die im Folgenden synonym verwendet werden. Sofern der Wirkstoff ein Wirkstoff zur Prophylaxe ist, kann es sich insbesondere um Substanzen handeln, die beispielsweise für eine Impfung geeignet sind. Bei der Diagnose werden die Lipide, die Liposome und/oder die Nanokapseln in vivo, in 30 vitro oder ex vivo verwendet, um pathogene Modifikationen eines Organismus beziehungsweise einer Gewebekultur oder eines anderen isolierten Körperbestandteils zu detektieren. Bei Verwendung der Lipide, der Liposome und/oder der Nanokapseln in der Therapie wird die Heilung von 35 Krankheiten und die Wiederherstellung des gesunden

Ausgangszustandes oder die Herstellung des nicht-pathogenen Ausgangszustandes angestrebt, wobei die Abwesenheit von einer bestimmten Krankheit nicht bedeutet, dass der Organismus keine andere pathogene Veränderung aufweisen kann. D.h., bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Struktur bei einer Behandlung und Heilung einer Virenerkrankung kann der Organismus noch eine Tumorerkrankung umfassen, die in diesem zunächst nicht mitbehandelt wird. Selbstverständlich kann auch vorgesehen sein, dass mehrere Krankheiten zeitgleich oder zeitversetzt durch die erfindungsgemäßen Strukturen behandelt werden. Bei der Verlaufskontrolle kann es sich beispielsweise um eine Diagnose handeln, die in mehreren zeitlichen Abständen parallel zu einer Therapie durchgeführt wird. Hierbei kann es sich insbesondere um eine Behandlung von Stoffwechselerkrankungen, Krebserkrankungen, immunologischen Erkrankungen oder genetischen Erkrankungen handeln. Der Therapieerfolg wird dann mit Hilfe der in der Verlaufskontrolle eingesetzten Lipide, Liposomen oder Nanokapseln verfolgt und kontrolliert. Die Nachbehandlung umfasst insbesondere diagnostische und therapeutische Handlungen, nach denen ein Heilerfolg zum Teil beziehungsweise im Wesentlichen bereits vollständig eingetreten ist.

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Lipid, mindestens ein erfindungsgemäßes Liposom und/oder eine erfindungsgemäße Nanokapsel, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Hierbei kann es insbesondere vorgesehen sein, dass die erfindungsgemäßen Strukturen mit oder ohne einen Wirkstoff als pharmazeutische Zusammensetzung verwendet werden.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann insbesondere als Arzneimittel eingesetzt werden. Hierzu ist es beispielsweise möglich, die Lipide und/oder Liposomen und/oder Nanokapseln durch dem Fachmann bekannte Verfahren 5 zu modifizieren. Vorteilhafterweise werden die erfindungsgemäßen Liposome nicht durch Complementkomponenten oder Perforin angegriffen und können so zum Transport von Wirkstoffen eingesetzt werden.

10 Arzneimittel oder pharmazeutische Zusammensetzungen, die vorliegend synonym verwendet werden, sind erfindungsgemäß Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen, insbesondere Lipide, Liposomen und/oder Nanokapseln, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen Körper Krankheiten, 15 Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern oder zu verhüten. Medizinische Hilfsstoffe oder Träger sind erfindungsgemäß solche Stoffe, die zur Produktion als aktive Ingredienzien von Arzneimitteln eingesetzt werden. Pharmazeutisch-technische 20 Hilfsstoffe dienen der geeigneten Formulierung des Arzneimittels oder der pharmazeutischen Zusammensetzung und können sogar, sofern sie nur während des Herstellungsverfahrens benötigt werden, anschließend entfernt werden oder können als pharmazeutisch verträgliche 25 Träger Teil der pharmazeutischen Zusammensetzung sein. Die Arzneimittelformulierung oder Formulierung der pharmazeutischen Zusammensetzung erfolgt gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Verdünnungsmittel. Beispiele für geeignete 30 pharmazeutisch verträgliche Träger umfassen Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, Gele, sterile Lösungen, etc. Arzneimittel oder pharmazeutische Zusammensetzungen, die solche Träger umfassen, können mittels bekannter konventioneller Methoden formuliert 35 werden. Diese Arzneimittel oder pharmazeutischen

Zusammensetzungen können einem Individuum in einer geeigneten Dosis verabreicht werden, beispielsweise in einem Bereich von $1\mu\text{g}$ bis 10 g an Lipiden, Liposomen und/oder Nanokapseln mit und/oder ohne eingeschlossenen Wirkstoff pro Tag und Patient. Bevorzugt werden dabei Dosen von 1 mg bis 1 g, die sich sowohl auf die Lipide, Liposomen, Nanokapseln und/oder den durch sie transportierten Wirkstoff beziehen können. Bevorzugt wird eine Verabreichung von möglichst wenigen und niedrigen Dosen und weiter bevorzugt eine einmalige oder mehrmalige Dosis. Die Verabreichung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, beispielsweise intravenös, intraperitoneal, intrarektal, intragastrointestinal, intranodal, intramuskulär, lokal, beispielsweise in den Tumor, aber auch subkutan, intradermal oder auf der Haut oder über die Schleimhäute.

Die Verabreichung kann auch in Form von Gen-Therapien geschehen, wobei die Lipide, Liposomen und/oder Nanokapseln eingesetzt werden, um Nukleinsäuren zu transportieren.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen oder das Arzneimittel umfassen insbesondere eine pharmakologische Substanz, die von den Lipiden, Liposomen und/oder Nanokapseln eingeschlossen oder gebunden wird. Diese können entweder alleine mit den entsprechenden unter Arzneimitteln oder pharmazeutischen Zusammensetzungen beschriebenen Hilfsstoffen oder in Kombination mit einem oder mehreren Adjuvantien, beispielsweise QS-21, GPI-0100 oder Emulsionen wie beispielsweise Montanide, Adjuvantien, DNA-Verbindungen wie beispielsweise CpG, Detox, bakteriellen Vakzinen, Salze wie beispielsweise Kalziumphosphate und/oder einem anderen geeigneten Stoff zur Wirkungsverstärkung verabreicht werden; vorzugsweise immunstimulatorische Moleküle, wie Interleukine, beispielsweise IL-2, IL-12, IL-4 und/oder

Wachstumsfaktoren, beispielsweise GM-CSF. Diese werden in bekannten Methoden mit den erfindungsgemäßen Lipiden, Liposomen und/oder Nanokapseln gemischt und in einer geeigneten Formulierung und Dosierung verabreicht.

5 Formulierungen, Dosierungen und geeignete Komponenten sind dem Fachmann bekannt.

Die pharmazeutische Zusammensetzung oder das Arzneimittel kann selbstverständlich auch eine Kombination von zwei oder 10 mehreren der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen oder Arzneimittel sein, sowie eine Kombination mit anderen Arzneimitteln, wie beispielsweise Antikörpertherapien, Chemotherapien oder Radiotherapien, die auf eine geeignete Weise zeitlich gemeinsam oder 15 getrennt verabreicht bzw. angewandt werden. Die Herstellung der Arzneimittel oder pharmazeutischen Zusammensetzungen erfolgt nach an sich bekannten Methoden.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, umfassend mindestens 20 ein erfindungsgemäses Lipid, mindestens ein erfindungsgemäses Liposom, mindestens eine erfindungsgemäße Nanokapsel und/oder eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung, gegebenenfalls mit einer Information zum Kombinieren der Inhalte des Kits und/oder zur 25 Bereitstellung einer Formulierung und dem Algorithmus der Gabe der Formulierung, d.h. in welchen Dosis- oder Zeitintervallen insbesondere einem Patienten einzelne Bestandteile des Kits verabreicht werden. Der Empfänger im Sinne der Erfindung kann jedoch auch eine Zelle oder ein 30 Gewebe in vivo, ex vivo oder in vitro sein. Bei der Information kann es sich beispielsweise um einen Beipackzettel aber auch um eine Information handeln, die der Anwender fernmündlich oder über Internet abrufen kann. Der Algorithmus der Gabe der Formulierung beinhaltet 35 insbesondere eine Anleitung zum diagnostischen und/oder

therapeutischen Verfahren zur Behandlung eines Patienten. Hierbei kann es sich um einstufige als auch mehrstufige Verfahren handeln, als auch um solche, die in Ab- oder Anwesenheit eines Arztes durchgeführt werden. D.h., das 5 Therapieschema bzw. die Information über dieses können ein Bestandteil des Kits sein.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Lipide, der erfindungsgemäßen Liposomen, 10 der erfindungsgemäßen Nanokapseln, des erfindungsgemäßen Kits und/oder zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krankheiten, insbesondere zur Behandlung von genetischen, immunologischen, Stoffwechsel- oder Zellwachstumsstörungen-Krankheiten; bevorzugt Auto- 15 immunerkrankungen, Durchblutungserkrankungen, Tumorerkrankungen, Immunschwächeerkrankungen, Erkrankungen, die einzelne Organe oder komplette Organbereiche beziehungsweise Gewebe betreffen, sowie Erkrankungen, die 20 ursächlich von Viren, Bakterien oder Parasiten hervorgerufen werden.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Wirkstoffbeladung der Liposomen, wobei ein definierter pH-Wert zur Verkapselung benutzt wird und ein zweiter pH-Wert 25 zur Abtrennung des nicht gebundenen Wirkstoffes eingestellt wird.

Die Erfindung betrifft auch Verwendung der Liposomen zur Herstellung von Nanokapseln.

30 Die Erfindung betrifft weiterhin Verwendung der Liposomen zur Herstellung von Freisetzungssystemen in der Diagnostik.

Mit Vorteil werden die Liposomen zum Transport und/oder zur Freisetzung von Wirkstoffen verwendet.

Zweckmäßig ist in einer weiteren Ausgestaltung Verwendung der Liposomen Depotformulierung und/oder als zirkulierendes Depot.

5 Mit Vorteil können die Liposomen insbesondere bei intravenöser oder peritonealer Applikation verwendet werden.

10 Vorteilhaft ist in einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung die Verwendung der Liposomen als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in vitro und ex vivo.

15 Es wurde darüber hinaus überraschenderweise gefunden, dass in Liposomen, deren Membran die hier beschriebenen Verbindungen enthält, überdurchschnittlich hohe Mengen an Proteinen oder DNA eingeschlossen werden können. Die Effizienz dieses Einbaus ist dabei abhängig vom pH-Wert der 20 verwendeten Lösung. Ein Prozess für die effiziente Verkapselung von Proteinen oder DNA in die Liposomen kann daher so geführt werden, dass zunächst ein pH-Wert eingestellt wird, der zu einer guten Bindung der Cargomoleküle in die Liposomen führt. Für DNA als Polyanion werden hier niedrige pH-Werte von etwa 4 bis 5 verwendet. Bei Proteinen richtet sich der nutzbare pH-Wert nach dem 25 isoelektrischen Punkt des Proteins. Dieser sollte unterhalb des pKa-Wertes der erfindungsgemäßen Substanz liegen. Eine Verkapselung ist dann besonders effektiv, wenn der pH-Wert des Mediums so gewählt wird, dass er zwischen dem isoelektrischen Punkt des Proteins und dem pKa-Wert des 30 fakultativ kationischen Lipids liegt. Die Proteine sind dann negativ geladen, die Lipidschicht hat bereits eine positive Nettoladung.

35 Nicht eingebaute, außen anhaftende Cargomoleküle können wenn nötig durch einen einfache Erhöhung des pH-Wertes

entfernt werden. Dieser Schritt ist immer dann notwendig, wenn nicht eingebaute Cargomoleküle zu einer Aggregation der Liposomen führen. Vorteilhaft bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Komponenten ist die Tatsache, dass die 5 eingeschlossenen Wirkstoffe nur für den Zeitraum des eigentlichen Einschlusses unter Bedingungen gebracht werden müssen, die eine Interaktion mit der Lipidschicht erlauben. Sobald die Lipidschicht in sich geschlossen bleibt, kann zu anderen Bedingungen gewechselt werden. Eine denkbare 10 Inaktivierung von Wirkstoffen, insbesondere von Proteinen, kann dadurch minimiert werden.

Liposomen, die die erfindungsgemäßen Komponenten umfassen, können unter dem Fachmann bekannten Bedingungen mit 15 Polymeren beschichtet werden. Dabei kann insbesondere eine einfache oder mehrfache Abscheidung solcher Substanzen auf der Oberfläche erfolgen. Bei einer mehrfachen Abscheidung, die gegebenenfalls unter Anwesenheit von Vernetzer durchgeführt wird, entstehen liposomale Nanokapseln, wie 20 sie in der WO 00/28972 oder in der WO01/64330 beschrieben sind und in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen sind.

Vorteilhaft bei der Verwendung der hier beschriebenen 25 Substanzen ist die Tatsache, dass die elektrostatische Interaktion mit dem Polyelektrolyten unterbrochen werden kann. Es ist bekannt, dass die Wechselwirkung eines Polyelektrolyten mit Ladungsträgern der liposomalen Membran zur Entmischung von Membranbestandteilen und zur Bildung 30 von Lipidclustern führen kann. In vielen Fällen geht diese Entmischung mit einer Permeabilisierung des Liposoms einher. Die erfindungsgemäßen Substanzen ermöglichen eine Abschaltung dieser Wechselwirkung nach dem Beschichtungsprozess. Wird der pH-Wert zu diesem Zeitpunkt

erhöht, so sind die Liposomen nur noch sterisch in der Nanokapseln eingeschlossen, eine Wechselwirkung der Membran mit den Polyelektrolyten besteht dann nicht mehr. Clusterbildung der Lipide und damit verbundene 5 Permeabilisierung der Membran können so umgangen werden.

In einer Variante dieser erfindungsgemäßen Lehre werden die Permeabilitätsänderungen gezielt zur Beladung von Liposomen genutzt. Ein einzuschließender Wirkstoff kann dabei unter 10 Bedingungen hoher Permeabilität ins Medium zugegeben werden. Anschließend werden Bedingungen geringer Permeabilität eingestellt. Damit verbleibt der Wirkstoff im Innern der Liposomen. Nicht eingeschlossener Wirkstoff kann dann gegebenenfalls abgetrennt werden. Eine solche 15 Permeabilitätsänderung kann an Liposomen oder an liposomalen Nanokapseln herbeigeführt werden.

Weiterhin wurde überraschend gefunden, dass die erfindungsgemäßen Liposomen bei niedrigem pH-Wert leicht 20 mit anderen Membranen fusionieren. Für gewöhnlich erfordert dieser Schritt die Anwesenheit eines größeren Anteils von PE in der Membran. Dieses hat durch seine Neigung zur Bildung von hexagonalen Phasen die Funktion eines Helferlipids. Nachteilig ist aber die geringere Stabilität 25 solcher Membranen, hier wird oft eine schleichende Freisetzung von eingeschlossenen Wirkstoffen beobachtet.

Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen hergestellt werden, fusionieren aber effektiv 30 auch in Abwesenheit eines solchen Helferlipids. Es sind also unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen solche Liposomen herstellbar, die einen Wirkstoff stabil verkapseln können, aber unter den Bedingungen eines niedrigen pH-Werts mit Zellmembranen fusionieren und dort 35 den Wirkstoff freisetzen.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Verwendung von Liposomen für experimentelle oder therapeutische Zwecke ist deren Verträglichkeit mit Zellen und Geweben. Eine Reihe 5 bekannter Verbindungen, die für das Einbringen von DNA oder Proteinen in Zellen genutzt werden (beispielsweise das kationische Lipid DOTAP), sind zytotoxisch.

Es wurde weiterhin überraschenderweise gefunden, dass die 10 erfindungsgemäßen Verbindungen eine verringerte Zytotoxizität zeigen. Das ist insbesondere dann der Fall, wenn die Verbindungen physiologische Bausteine wie etwa Aminosäuren enthalten.

15 Eine weitere Voraussetzung für die Konstruktion von Vektoren zum Gen- oder Proteintransport in Zellen ist deren Kompatibilität mit Serum oder Blut. Wegen ihrer starken kationischen Ladung bilden die derzeit bekannten Vektoren mit Serum unkontrollierte große Aggregate, die im 20 Organismus zur Bildung von Thromben führen. Ihre Verwendung ist damit *in vivo* praktisch ausgeschlossen und auf *in vitro* oder *ex vivo* Anwendungen beschränkt.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Liposomen, die 25 unter Verwendung der erfindungsgemäßen Komponenten aufgebaut wurden, in Serum oder Blut keine Aggregate bilden.

Eine nächste Voraussetzung für die Konstruktion von 30 Vektoren zum Protein- oder Gentransfer ist deren Stabilität unter physiologischen Bedingungen. Liposomen werden bei einer Applikation in den Blutkreislauf vom Bestandteilen des Complementsystems angegriffen und schnell lysiert. Diese Reaktion erfolgt binnen Minuten. Es kommt zur 35 Porenbildung in der Membr an, durch die selbst große

Moleküle wie Proteine ausdiffundieren können. Eine Stabilisierung von Liposomen gegenüber diesen Mechanismen ist bisher nur durch Einbau von Cholesterol in die Lipidschicht möglich. Solche Liposomen sind dann sehr 5 stabil, können aber nicht mehr mit Zellen wechselwirken oder ihren Wirkstoff leicht abgeben. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Komponenten aufgebaut werden, in Serum oder Blut über mehrere Stunden stabil 10 sind. Die Wirkstofffreisetzung ist auch unter diesen Bedingungen gering.

Ein liposomaler Vektor für den Transport von Wirkstoffen muss mindestens drei Voraussetzungen erfüllen: Er muss eine 15 geringe Toxizität besitzen, den Wirkstoff sicher und stabil einschließen und kompatibel mit Serum oder Blut sein.

Alle drei dieser Voraussetzungen werden von Liposomen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen 20 hergestellt sind, erfüllt. Die hier offenbarten Liposomen sind daher für eine Verwendung bei therapeutischen Zwecken gut geeignet. Weitere Eigenschaften, die diese Verwendung unterstützen sind die gute Beladbarkeit mit Wirkstoffen und die gezielte Freisetzung dieser Stoffe durch 25 Permeabilisierung der Membran bei geeigneten pH-Werten.

Die Erfindung soll im Folgenden anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne dass die Erfindung auf diese Beispiele zu beschränken ist.

Beispiel 1**Synthese von #59 (Histamin-Dipalmitoylglycerolsuccinat)**

1,7g Dipalmitoylglycerolsuccinat werden bei Raumtemperatur
5 in 20ml DMF gelöst. Zur Lösung werden 400mg Carbonyldiimidazol, gelöst in 20ml DMF gegeben. Man lässt das Gemisch 1 Stunde rühren und gibt dann 300mg Histamin zu. Nachdem das Gemisch über Nacht gerührt wurde, engt man im Vakuum vollständig ein. Der Rückstand wird
10 säulenchromatografisch an Kieselgel 60 gereinigt, als Laufmittel wird Chloroform/Methanol 10:1 verwendet.

Beispiel 2**Synthese von Verbindung #60 4-(2-Aminoethyl)-Morpholin-Dipalmitoyl-glycerolsuccinat**

Bei dieser Synthese verfährt man wie in Beispiel 1, nur verwendet man anstelle des Histamins 350mg 4-(2-Aminoethyl)-Morpholin.

Beispiel 3**Herstellung von kationischen pH-sensitiven Liposomen**

25 12 mg einer Mischung von DMPC/#60/Chol in den molaren Verhältnissen 50:15:35 werden in 4 ml Chloroform/ Methanol (1:1, v/v) gelöst und im Rotationsverdampfer vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit 4ml des entsprechenden Puffers (10 mM KAc, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH7.5) in
30 einer Lipidkonzentration von 5mM durch kurzes Ultrabeschallen hydratisiert (5 min). Abschließend wird die Emulsion eingefroren und nach dem Tauen mehrfach extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonatfilter 200nm Porenweite).

Der Verlauf des Zetapotentials bei verschiedenen pH-Werten ist in der untenstehenden Tabelle dargestellt.

DMPC/#60/Chol 50:15:35

5

pH-Wert	Zetapotential in mV
4	+54
5	+36
6	+16
7,5	-15

Beispiel 4

10 In-situ-Herstellung von Verbindung #30 (2-Histamin-(1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxo-phosphoryloxy)-ethyl)

15 Unilamellare Liposomen (DPPC / DPPG / Cholesterol 40:20:40 Mol%) werden in einer Konzentration von 20mM Lipid in einem Borat-Puffer (20mM Natriumborat, 120 mM Natriumchlorid pH 8,4) suspendiert. Zu 2 ml dieser Lösung werden 400 µl einer 0,6 M Natriumperiodatlösung zugegeben, die Mischung wird für 30 min im Dunkeln inkubiert. 1 ml einer solchen Suspension wird an Sephadex G 25 im oben verwendeten Boratpuffer chromatografiert. Das Eluat der 20 Liposomensuspension wird auf 4 ml aufgefüllt.

25 Zu den so oxidierten Liposomen wird Histamin in einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben und 2 Stunden inkubiert. Abschließend wurde mit 20 mM Natriumborhydrid über Nacht bei 4°C reduziert. Überschüssiges Histamin kann durch Chromatografie an Sephadex G25 wie oben abgetrennt werden.

Beispiel 5**Bestimmung pKa-Werte**

15 mg des entsprechenden Lipids werden in Chloroform gelöst
5 und zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeengt, bis ein Lipidfilm entsteht. Dieser wird in 20 mL einer Lösung von 0,5 % TRITON-X-100 in Wasser aufgenommen und mit HCl wird pH 3,0 eingestellt. Die Lösung wird dann in 100 μ L-Schritten mit 20mM NaOH titriert und die pH-Werte aufgenommen.

10

Verbindung	pKa
#60	7,2
#59	5,5
#30	6,7

Beispiel 6**Herstellung von mit DNA-Plasmiden beladenen Liposomen**

15

1,43 mM des pH-sensitiven Lipids werden je nach Lipidzusammensetzung des Lipidfilmes mit den anderen Lipiden in Chloroform gelöst. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der Lipidfilm über Nacht im Vakuum 20 getrocknet.

Der Lipidfilm wird direkt mit 1 ml DNA-haltigen (100 μ g DNA / ml) NaAc-Puffer (10 mM NaAc, 150 mM NaCl, pH 4) hydratisiert (leichter Ultraschall, anschließend für 30 min oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur rotiert).

25

Anschließend erfolgt ein freeze/thaw-Schritt.

Die Mischung wird 10 °C oberhalb der Phasenumwandlungs-temperatur 15fach durch 400 nm-Membranen extrudiert.

Nicht eingeschlossenen DNA kann durch Flotation im Sucrose-Gradienten (bei pH 7.5) abgetrennt werden (0,8 M Sucrose, 0,5 M Sucrose, Puffer).

Der Gehalt an DNA wird mit Hilfe des Interkalationsfarbstoffes Propidiumiodid durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Interkalation in die DNA bestimmt. Dazu werden 20 μ l Propidiumiodid, 6 μ l Triton X-100 (10 % in Wasser) mit Probe auf 300 μ l aufgefüllt und mit einem Fluoreszenzplattenreader vermessen.

10

Beispiel 7

Messung der Serumaggregation von Liposomen

Zu 140 μ L Humanserum werden 10 μ l einer 25mM Liposomensuspension pipettiert und gut gemischt. Davon werden 65 μ L abgenommen und mit 1,5 ml Puffer (HEPES 10mM, NaCl 150mM pH 7,5) verdünnt. Der Rest wird für 2 h bei 37°C inkubiert und wieder werden 65 μ L abgenommen und mit 1,5 mL Puffer verdünnt. Von beiden Proben werden die Partikelgrößen mit einem Malvern Zetasizer 3000 bestimmt. Parallel dazu werden Kontrollproben nur in Puffer aufgenommen, die ebenfalls 2 h bei 37°C inkubiert wurden. Eine unveränderte Partikelgröße zeigt eine gute Serumverträglichkeit an.

25

Patentansprüche

5 1. pH-sensitives, kationisches Lipid mit einem pKa-Wert zwischen 3,5 und 8 nach der allgemeinen Formel (I):

(I) Kation - Spacer 2 - Y - Spacer 1 - Amphiphil

10 wobei

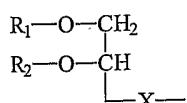
(a) das Kation aus der Gruppe umfassend Imidazol, Morpholin, Piperazin, Purin, Pyridin und/oder Pyrimidin oder ein Derivat hiervon ausgewählt ist,

15 (b) die Spacer 1 und/oder Spacer 2 Niederalkylreste mit bis zu 8 C-Atomen mit linearer, verzweigter oder ringförmiger Struktur und 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen und/oder 0 bis 20 4 Hydroxylgruppen sind,

25 (c) Y eine Deletion; $-(C=O)-O-$; $-(C=O)-NH-$; $-NH-(C=O)-O-$; $-O-$; $-NH-$; $-CH=N-$; $-O-(O=C)-$; $-S-$; $(O=C)-$; $-NH-(O=C)-$; $-O-(O=C)-NH-$; $-N=CH-$ und/oder $-S-S-$ umfasst,

30 (d) das Amphiphil eine Struktur nach der allgemeinen Formel (II) oder (III) ist:

(II)



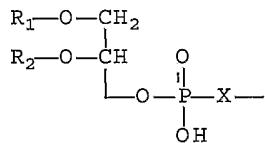
wobei

R1 und R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Alkyl oder Acylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind und X ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend eine
 5 Deletion; -O-(C=O); -NH-(C=O)-; -S-(C=O)-; -O-; -NH-; -S-; -N=CH-; -(O=C)-O-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)-; -N=CH- und/oder -S-S-

10 oder

15

(III)



15

wobei

20 R1 und R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Acylketten mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigte Bindungen sind und X -O- ist.

2. Lipid nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
25 der Molekülbaustein Amphiphil eine C8-C30-Alkoholen-
veresterte 1,4- oder 1,5- Dicarbonsäure ist.
3. Lipid nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
30 die Dicarbonsäure eine Asparaginsäure, eine
Glutaminsäure, eine Äpfelsäure, eine Weinsäure, eine
Citronensäure, eine Aconitsäure, eine Citraconsäure
und/oder eine Maleinsäure ist.

4. Lipid nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Molekülbaustein Amphiphil ausgewählt wird aus der
Gruppe der Diamide von 3-Aminoalanin,
5 Diaminobuttersäure, Ornithin oder Lysin mit C8-C30-
Fettsäuren.
- 10 5. Lipid nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Molekülbaustein Amphiphil eine Verbindung nach der
allgemeinen Formel (IV) ist:

15



20

wobei R1 und R2 unabhängig voneinander C8 bis C30 Alkyl mit 0, 1 oder 2 ethylenisch ungesättigten Bindungen sind und
X ist ausgewählt aus der Gruppe umfassend eine Deletion; -O-; -NH- und/oder -S-.

25

6. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
R1 und R2 unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-,
Stearoyl-, Oleoyl- und/oder Linoyl-Resten und/oder
30 deren entsprechenden Alkoholen.
7. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
es einen pKa-Wert zwischen 4 und 6,5 aufweist.

8. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die verbindenden Gruppen X und/oder Y ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus -(C=O)-O-; -(C=O)-NH-; -(C=O)-S-; -O-; -NH-; -S-; -CH=N-; -O-(O=C)-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)- und/oder -N=CH-.
9. Lipid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Spacer 1 und/oder Spacer 2 ein Zucker und/oder ein Polyethylenglykol mit bis zu 20 Monomereinheiten umfasst.
- 15 10. Liposomen umfassend pH-sensitive, kationische Lipide nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Liposomen nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen zwischen 5 und 50 mol%, bevorzugt zwischen 5 mol% und 40 mol% und besonders bevorzugt zwischen 10 mol% und 30 mol% der Lipide umfassen.
- 20 12. Liposomen nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Ceramid, Sphingolipid, Tetraetherlipid, Cholesterol und/oder Diacylglycerol umfassen.
- 25 30 13. Liposomen nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen anionische Lipide, insbesondere Phosphatidylserin, Phosphatidsäure und/oder CHEMS umfassen.

14. Liposomen nach einem der Ansprüche 10 bis 13,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Liposomen eine mittlere Größe zwischen 50 und 1000
nm, bevorzugt zwischen 50 und 300 nm, besonders
5 bevorzugt zwischen 60 und 130 nm aufweisen.
15. Liposomen nach einem der Ansprüche 10 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, dass
10 die Liposomen einen Wirkstoff umfassen.
16. Liposomen nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass
15 der Wirkstoff ein Protein, ein Peptid, eine DNA, eine
RNA, ein antisense-Nukleotid und/oder ein Decoy-
Nukleotid ist.
- 20 17. Liposomen nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
mindestens 50 µg, bevorzugt mehr als 90 µg, besonders
bevorzugt mehr als 150 µg des Wirkstoffes pro mg Lipid
im Innern des Liposoms eingeschlossen sind.
- 25
18. Nanokapseln umfassend Lipide nach einem der Ansprüche 1
bis 9 und/oder Liposomen nach einem der Ansprüche 10
bis 17.
- 30
19. Lipide nach einem der Ansprüche 1 bis 9, Liposomen nach
einem der Ansprüche 10 bis 17 und/oder Nanokapseln nach
Anspruch 18 zur Verwendung als medizinischer Wirkstoff.

20. Lipid, Liposomen und/oder Nanokapseln nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Wirkstoff ein Wirkstoff zur Prophylaxe, Diagnose,
5 Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung
ist.
- 10 21. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend mindestens
ein Lipid nach einem der Ansprüche 1 bis 9, mindestens
ein Liposom nach einem der Ansprüche 10 bis 17 und/oder
mindestens eine Nanokapsel nach Anspruch 18
gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch
verträglichen Träger.
- 15 22. Kit umfassend mindestens ein Lipid nach einem der
Ansprüche 1 bis 9, mindestens ein Liposom nach einem
der Ansprüche 10 bis 17, mindestens eine Nanokapsel
nach Anspruch 18 und/oder eine pharmazeutische
Zusammensetzung nach Anspruch 21 gegebenenfalls
20 zusammen mit einer Information zum Kombinieren der
Inhalte des Kits, zur Bereitstellung einer Formulierung
und/oder dem Algorithmus der Gabe der Formulierung bei
einem Empfänger.
- 25 23. In vivo-Transfektionssystem, dadurch gekennzeichnet,
dass
es mit genetischem Material beladene Liposomen nach
einem der Ansprüche 10 bis 17 umfasst.
- 30 24. Verfahren zur Wirkstoffbeladung der Liposomen gemäß
einem der Ansprüche 10 bis 17,
dadurch gekennzeichnet, dass
ein definierter pH-Wert zur Verkapselung benutzt wird
und ein zweiter pH-Wert zur Abtrennung des nicht
35 gebundenen Wirkstoffes eingestellt wird.

25. Verwendung der Liposomen gemäß einem der Ansprüche 10 bis 17 zur Herstellung von Nanokapseln.

5 26. Verwendung eines Lipids nach einem der Ansprüche 1 bis 9, eines Liposoms nach einem der Ansprüche 10 bis 17, einer Nanokapsel nach Anspruch 18, eines Kits nach Anspruch 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krankheiten.

10

27. Verwendung der Liposomen gemäß einem der Ansprüche 10 bis 17 zur Herstellung von Freisetzungssystemen in der Diagnostik.

15 28. Verwendung der Liposomen gemäß einem der Ansprüche 10 bis 17 zum Transport und/oder zur Freisetzung von Wirkstoffen.

20 29. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 10 bis 17 als Depotformulierung und/oder als zirkulierendes Depot.

30. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 10 bis 17 bei intravenöser oder peritonealer Applikation.

25

31. Verwendung der Liposomen nach einem der Ansprüche 10 bis 17 als Vektor zur Transfektion von Zellen in vivo, in vitro und ex vivo.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/01661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/127 C07D233/64 C07D295/088 C07D295/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 26629 A (ALZA CORP) 19 April 2001 (2001-04-19) claims 1,5 figure 1; example V ---	1-31
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 12, 29 October 1999 (1999-10-29) & JP 11 199488 A (SANKYO CO LTD), 27 July 1999 (1999-07-27) abstract ---	1-31
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 13, 30 November 1999 (1999-11-30) & JP 11 217328 A (NISSIN FOOD PROD CO LTD), 10 August 1999 (1999-08-10) abstract ---	1-31
-/-		

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- “E” earlier document but published on or after the international filing date
- “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 2003

Date of mailing of the international search report

28/05/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kollmannsberger, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/01661

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 965 434 A (GUREVICH VLADIMIR ET AL) 12 October 1999 (1999-10-12) column 5 -column 8 -----	1-31
A	WO 00 30444 A (UNIV VANDERBILT) 2 June 2000 (2000-06-02) Claims 1,18 -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/01661

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims 28-31 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the stated effects of the compound or composition.
2. Claims Nos.: **1-31 (in part)** because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplementary sheets PCT/ ISA/ 210
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

CONTINUATION OF BOX 1.2

Claims 1-31 (in part)

The claims are unclear in comparison with the description because many of the definitions in the description are inconsistent with the claims (see page 8, definition of the spacer as a sugar or PEG, definition of the cationic part (pages 8-9) as aniline, isoquinoline etc.). Equally, many of the structures described in Table 1 are not covered by the claims. Furthermore, the description states that various parts of the structures defined in the claims are optional and can be either replaced by other parts, exchanged with each other or omitted altogether (page 9, lines 26-36, and page 17). The scope of the claims is thus so unclear (PCT Article 6) that it is not possible to carry out a meaningful search. Moreover, the search in respect of the compounds defined in the claims initially yielded a very large number of documents detrimental to novelty. This number is so large that it becomes impossible to determine a subject matter in any of the claims for which protection might justifiably be sought (PCT Article 6). For these reasons a meaningful search covering the full scope of the claims appears impossible. The search was therefore confined to compounds according to Claim 1 in which the "cationic" part is derived from histamine, *N*-(2-aminoethyl)morpholine or *N*-(2-hydroxyethyl)morpholine, and to corresponding parts of Claims 10-31 (see Examples 1-7 in the description). For other parts of the claims only a small number of illustrative documents were cited.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/01661

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0126629	A	19-04-2001		AU 7868400 A		23-04-2001
				AU 8006400 A		23-04-2001
				CA 2386164 A1		19-04-2001
				CN 1378536 T		06-11-2002
				EP 1223916 A2		24-07-2002
				HU 0203117 A2		28-01-2003
				JP 2003511405 T		25-03-2003
				NO 20021615 A		05-04-2002
				WO 0126625 A2		19-04-2001
				WO 0126629 A2		19-04-2001
				US 2003031704 A1		13-02-2003
JP 11199488	A	27-07-1999		NONE		
JP 11217328	A	10-08-1999		NONE		
US 5965434	A	12-10-1999		NONE		
WO 0030444	A	02-06-2000		AU 1830200 A		13-06-2000
				WO 0030444 A1		02-06-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/01661

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K9/127 C07D233/64 C07D295/088 C07D295/13

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07D A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 26629 A (ALZA CORP) 19. April 2001 (2001-04-19) Ansprüche 1,5 Abbildung 1; Beispiel V ---	1-31
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 12, 29. Oktober 1999 (1999-10-29) & JP 11 199488 A (SANKYO CO LTD), 27. Juli 1999 (1999-07-27) Zusammenfassung ---	1-31
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 13, 30. November 1999 (1999-11-30) & JP 11 217328 A (NISSIN FOOD PROD CO LTD), 10. August 1999 (1999-08-10) Zusammenfassung ---	1-31

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20. Mai 2003

28/05/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kollmannsberger, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/01661**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 965 434 A (GUREVICH VLADIMIR ET AL) 12. Oktober 1999 (1999-10-12) Spalte 5 -Spalte 8 -----	1-31
A	WO 00 30444 A (UNIV VANDERBILT) 2. Juni 2000 (2000-06-02) Ansprüche 1,18 -----	1-31

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/01661**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 28–31 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. 1–31 (teilweise) weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-31 (teilweise)

Die Ansprüche sind unklar in bezug auf die Beschreibung, da viele Definitionen in der Beschreibung im Widerspruch zu den Ansprüchen stehen (vgl. Seite 8 Definition des Spacers als Zucker/PEG, Definition des kationischen Teils Seite 8/9 als Aniline, Isochinoline etc). Ebenso fallen viele der in der Tabelle 1 beschriebenen Strukturen nicht unter die Ansprüche. Des weiteren wird in der Beschreibung ausgeführt, dass verschiedene Teile der in den Ansprüchen definierten Strukturen optional sind und durch andere ersetzt, untereinander vertauscht oder ganz weggelassen werden können (Seite 9 Zeilen 26-36, Seite 17). Der beanspruchte Bereich ist daher so unklar (Art. 6 PCT), dass eine sinnvolle Recherche unmöglich ist. Überdies ergab die Recherche in bezug auf die in den Ansprüchen definierten Verbindungen in ihrer Anfangsphase eine sehr große Zahl neuheitsschädlicher Dokumente. Diese Zahl ist so groß, daß sich unmöglich feststellen lässt, für was in der Gesamtheit der Patentansprüche eventuell nach zu Recht Schutz begehrt werden könnte (Art. 6 PCT). Aus diesen Gründen erscheint eine sinnvolle Recherche über den gesamten Bereich der Patentansprüche unmöglich. Die Recherche wurde daher auf Verbindungen nach Anspruch 1, in denen der "kationische" Teil von Histamin, N-(2-Aminoethyl)morpholin oder N-(2-Hydroxyethyl)morpholin abgeleitet ist, und entsprechende Teile der Ansprüche 10-31 beschränkt (vgl. Beispiele 1-7 der Beschreibung). Für andere Teile der Ansprüche wurden nur wenige illustrative Dokumente zitiert.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/01661

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0126629	A	19-04-2001		AU 7868400 A AU 8006400 A CA 2386164 A1 CN 1378536 T EP 1223916 A2 HU 0203117 A2 JP 2003511405 T NO 20021615 A WO 0126625 A2 WO 0126629 A2 US 2003031704 A1		23-04-2001 23-04-2001 19-04-2001 06-11-2002 24-07-2002 28-01-2003 25-03-2003 05-04-2002 19-04-2001 19-04-2001 13-02-2003
JP 11199488	A	27-07-1999		KEINE		
JP 11217328	A	10-08-1999		KEINE		
US 5965434	A	12-10-1999		KEINE		
WO 0030444	A	02-06-2000		AU 1830200 A WO 0030444 A1		13-06-2000 02-06-2000