

(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

212 185

Int.Cl.³

3(51)

A 61 K 47/00

A 61 K 37/26

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 61 K/ 2463 096

(22) 21.12.82

(44) 08.08.84

(71) ADW DER DDR, BERLIN, DD

(72) SARRACH, DIETER, DR. RER. NAT. HABIL. DIPL.-CHEM.; SIEFKE, BAERBEL, DD;

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PHOSPHOLIPID-WIRKSTOFF-KOMBINATIONEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Phospholipid-Wirkstoff-Kombinationen hoher Beladungsdichte und abgestufter Wirkstoffabgabe, insbesondere zur Formulierung von Insulin, und löst die Aufgabe, den Wirkstoff in den Wasserkompartimenten der Lipidphase bzw. im Bereich der Lipid-Wasser-Grenzfläche anzureichern. Das wird erreicht, indem zwischen dem Wirkstoff und einem Phospholipidsystem reversible Affinitäts erhöhungen, z. B. durch elektrostatische Wechselwirkungen, induziert werden. Durch Änderung des Reaktionsmilieus, die auch im Applikationsbereich eines injizierten Präparates erfolgen kann, kann der Wirkstoff mit unterschiedlicher Kinetik wieder freigesetzt werden.

Verfahren zur Herstellung von Phospholipid-Wirkstoff-Kombinationen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Phospholipid-Wirkstoff-Kombinationen hoher Beladungsdichte und abgestufter Wirkstoffabgabe, insbesondere zur Formulierung von Insulin, d.h. also, ein Verfahren zur Fixierung von Wirkstoffen an Phospholipid als Trägermaterial, das die Herstellung von Aggregaten und Dispersionen mit hohem Wirkstoffanteil in der Phospholipidphase und abgestuftem Freisetzungsvermögen gestattet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Phospholipiddispersionen finden in Form sogenannter Liposomen zunehmendes Interesse als Trägermaterialien biologisch aktiver Verbindungen, um in vivo vorteilhafte biopharmazeutische Eigenschaften der Wirkstoffformulierung zu erzielen, z.B. Depotwirkung, Überwindung von Transportbarrieren, Effektsteigerung oder Erhöhung der Selektivität. Im Falle des Peptidhormons Insulin wird insbesondere der Schutz des Wirkstoffs vor den reaktiven Komponenten des Magen-Darmtraktes durch Bindung an die Lipidkomponente als Ursache der oralen Wirksamkeit derartiger Formulierungen angenommen, da freies Insulin proteolytisch gespalten wird und nur parenteral appliziert werden kann. Im Gegensatz zu anderen Trägern gelten Phospholipide als physiologisch unbedenklich.

Die bekannten Verfahren der Wirkstofffixierung an Phospholipidträgern aus wäßriger Lösung nutzen den Einschluß der Wirkstofflösung in die Wasserkompartimente der Liposomen aus. Liposomen enthalten ein oder mehrere Wasserkompartimente, die durch Lipid-Doppelschichten vom Außenmedium getrennt werden. Sie werden durch Dispergieren vorher entwässerter Phospholipide in der wäßrigen Lösung des Wirkstoffs oder durch Assoziation niedermolekularer Lipidmicellen in Gegenwart der Wirkstofflösung erzeugt. Die geringe Wassereinschlußkapazität in Teilchen kolloidaler Abmessungen ist allgemein bekannt. Daher wird eine Erhöhung der Teilchengröße, z.B. durch Umwandlung lecitinhaltiger nichtwäßriger Emulsionen in Liposomen durch sogenannte "reverse phase evaporation" angestrebt (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978), 4194 - 4198). Ein Nachteil liegt in der Gegenwart schwer entfernbare nichtwäßriger Lösungsmittel.

Die bisher angewandten Verfahren, insbesondere zum Einschluß von Insulin, setzen den Wirkstoff in Lösungen physiologischer Milieubedingungen im neutralen pH-Bereich ein. Das trifft auch auf die Anwendung dünndarmlöslicher Kapseln für Liposomen zu, die nach der Standardpräparation von Ryman und Mitarbeitern bei pH = 7,6 erfolgt (DE-OS 26 40 707). Unter diesen Bedingungen besteht zwischen neutralen bzw. negativen Phospholipidkomponenten und dem Wirkstoff nur geringe Wechselwirkung, wodurch die bekannten niedrigen Einschlußausbeuten von etwa 5 bis 20 % resultieren, da die Konzentration in den Wasserkompartimenten der Liposomen maximal den Wert in der Außenphase erreichen kann. Für Insulin wurde der Anteil adsorptiver Bindung unter diesen Milieubedingungen analysiert und gezeigt, daß er schnell einem Sättigungswert mit niedriger Beladungsdichte zustrebt (Isotopenpraxis 16 (1980) S. 10-16).

Es wurde auch versucht, durch chemische Modifizierung des Wirkstoffs, z.B. unter Anknüpfung eines Palmitoylrestes oder kovalente Bindung an Phospholipide, eine hohe Beladungsdichte zu gewährleisten. Infolge ihrer irreversiblen Natur muß jedoch diese Variante auf spezielle Anwendungsziele beschränkt bleiben.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung sind Phospholipid-Wirkstoff-Kombinationen hoher Beladungsdichte und abgestufter Wirkstoffabgabe.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung von Phospholipid-Wirkstoff-Kombinationen zu entwickeln, bei dem eine Anreicherung des Wirkstoffes in den Wasserkompartimenten der Lipidphase bzw. während der Präparation im Bereich der Lipid-Wasser-Grenzflächen stattfindet.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem Wirkstoff und einem Phospholipidsystem reversible Affinitätserhöhung induziert wird, die während der Präparation den Verteilungskoeffizienten zugunsten der Lipidphase vergrößert und durch Änderung des Reaktionsmilieus wieder rückgängig gemacht werden kann. Als einstellbare nichtkovalente Bindung kann insbesondere elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Lipidkomponente und dem entgegengesetzt geladenen Wirkstoff verwirklicht werden, indem z.B. das Lipid eine negativ geladene Komponente wie Phosphatidsäure, Phosphatidylserin oder dergleichen enthält, während ionisierbare Gruppen des Wirkstoffs durch Dissoziation in einem geeigneten pH-Bereich positiv geladen werden. Die Anreicherung des Wirkstoffes im Bereich der Lipidphase wird dabei in zwei Kompartimenten, nämlich der inneren und äußeren Lipid/Wasser-Grenzfläche, ermöglicht. Durch Änderung von pH- und Ionenstärke, die auch im Applikationsbereich eines injizierten Präparates erfolgen kann, kann der Wirkstoff mit unterschiedlicher Kinetik aus beiden Kompartimenten freigesetzt werden.

Beim Wirkstoff Insulin liegt ein optimaler pH-Bereich für die Bindung bei 3, während für die Wirkstoffe Ribonuklease und Cytochrom c breitere Wechselwirkungsbereiche vorliegen. Negativ geladene Mikrovesikel (sogenannte Monoschichtliposomen)

aggregieren und fusionieren in Wirkstofflösungen bei pH-Werten unter 4, wobei z.B. im Falle des Insulins bis zu 95 % des Wirkstoffs gebunden werden können. Außerdem wurde gefunden, daß die Aggregate in neutralen Salzlösungen peptisiert werden können, wobei in Abhängigkeit vom pH-Wert bis zu 85 % des Insulins relativ leicht an das Außenmedium abgegeben werden können, wenn z.B. die Präparation am Molekularsieb chromatographiert wird. Werden dagegen die Lipidartikel nach bekannten Verfahren, wie Alkoholinjektion oder Ultraschall, im wirkstoffhaltigen Reaktionsmedium selbst erzeugt, so bleiben noch im schwach alkalischen Bereich bis zu 50 % des Wirkstoffs im inneren Kompartiment fixiert. Die Freisetzung erfolgt dann bei Abbau der Lipidmembran, z.B. durch Detergentien, Lipasen oder andere Komponenten biologischer Systeme.

Durch Abtrennung des außen gebundenen Wirkstoffs nach der Präparation mittels Chromatographie oder Ultrafiltration kann auch eine Anreicherung des Wirkstoffs ausschließlich im inneren Kompartiment erzielt werden, so daß Kombinationen mit abgestufter Reaktionskinetik erhältlich sind. Schließlich tritt im Bereich erhöhter Lipid-Wirkstoff-Wechselwirkung eine vorteilhafte Teilchenvergrößerung im Vergleich zu inerten Systemen auf.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist an gegebene Bedingungen leicht anpaßbar. So kann die Reaktion sowohl mit vorgefertigten Liposomen als auch beim Dispergieren des Systems, z.B. mittels Ultraschall, durchgeführt werden. Günstig ist es, die Reaktion mit einer Lipidlösung in einer wasserlöslichen organischen Komponente ablaufen zu lassen. Das Reaktionsprodukt kann sowohl als Aggregat als auch als Dispersion erhalten werden.

Ausführungsbeispiel

1. 0,2 Volumina Mikrovesikel aus Lecithin und Phosphatidsäure (20 % Phosphatidsäure, 0,02 mol/l Phospholipid, 0,5 % Tocopherol) werden mit 0,5 Volumina Insulinlösung

- (0,2 mmol/l) in 0,1 m Citratpuffer, pH = 3,2, vermischt und nach einstündigem Stehen abzentrifugiert. 70 % des Insulins sind an das Lipid gebunden.
Die Beladungsdichte erhöht sich proportional dem Phosphatidsäuregehalt.
Die erhaltenen insulinbeladenen Aggregate zeichnen sich durch eine schnelle Wirkstoffabgabe aus.
2. 0,13 mmol getrocknetes Lipidgemisch (Eilecithin mit 20 % Phosphatidsäure, 1 % Tocopherol, 0,10 % Cholestein) wird mit 0,005 l Insulinlösung (0,85 mmol/l) in Citratpuffer, pH = 3,2, geschüttelt und unter Kühlung in Argonatmosphäre mittels Ultraschall dispergiert. Das Produkt wird abzentrifugiert. Die Ausbeute beträgt 93 %, d.h., dieser Teil des eingesetzten Insulins ist an das Lipid gebunden. Die entstehenden Aggregate sind durch eine biphasische Wirkstofffreisetzung gekennzeichnet.
 3. Die nach der Zentrifugation gemäß Beispiel 2 erhaltenen Zentrifugationspellets werden in 0,1 m Trispuffer, pH = 7, peptisiert und an einer Molekularsiebsäule, z.B. mit Sephadex G 150, chromatographiert. Die Ausbeute beträgt 45 %. Während durch Einwirkung von Pronase 7 % des Insulins abgespalten werden, sind es in Gegenwart von Desoxycholat im Überschuß 95 %, d.h., es handelt sich im vorliegenden Falle um Dispersionen mit langsamer Wirkstoffabgabe.
 4. Der Lipidansatz wie in Beispiel 2 wird mit 0,005 l einer Lösung von $2 \cdot 10^{-6}$ kg Nicht-Histonprotein aus Zellkernen in destilliertem Wasser inkubiert und nach Zusatz von 0,001 l Puffer, pH = 4,5, mittels Ultraschall dispergiert. Nach Abschluß der Säulenchromatographie sind 60 % des Kernproteins im Lipid gebunden.
 5. Zu 0,008 l Insulinlösung (82 μ mol/l in 0,1 m Citrat, pH = 3) wird unter Rühren langsam 0,0015 l alkoholische Phospholipidlösung, 0,004 mol/l, zugefügt. Das Reaktionsprodukt wird abzentrifugiert, in 0,1 m Trispuffer peptisiert und, wie oben beschrieben, chromatographiert. 30 % des eingesetzten Insulins sind im Lipid fixiert.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Phospholipid-Wirkstoff-Kombinationen hoher Beladungsdichte und abgestuftem Retentionsvermögen, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem Wirkstoff und einem Phospholipidsystem reversibel eine Affinitätserhöhung induziert wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Lipidsystem negativ geladene Komponenten und der Wirkstoff dissoziierbare Gruppen enthält und die physikochemische Wechselwirkung durch Einstellung eines optimalen pH-Bereiches erzielt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion mit vorgefertigten Liposomen durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion beim Dispergieren des Systems, z.B. mittels Ultraschall, durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion mit einer Lipidlösung in einer wasserlöslichen organischen Komponente durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Insulin eingesetzt und die Reaktion im sauren Milieu durchgeführt wird.