



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 29 391 T2** 2005.06.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 959 874 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 29 391.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/11696**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 933 287.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/000111**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.07.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **08.01.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.12.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **02.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.06.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **A61K 9/12**

**A61K 9/127, A61K 9/00, A61K 31/58,  
A61K 38/13**

(30) Unionspriorität:

|               |                   |           |
|---------------|-------------------|-----------|
| <b>675654</b> | <b>03.07.1996</b> | <b>US</b> |
| <b>731605</b> | <b>16.10.1996</b> | <b>US</b> |

(73) Patentinhaber:

**Research Development Foundation, Carson,  
Nevada, US**

(74) Vertreter:

**Meissner, Bolte & Partner GbR, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**WALDREP, Clifford, J., The Woodlands, US;  
KNIGHT, Vernon, Houston, US; BLACK, Melanie  
B., The Woodlands, US**

(54) Bezeichnung: **HOCHDOSIERTE LIPOSOMALE AEROSOLFORMULIERUNG**

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

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

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Gebiete der biochemischen Pharmakologie und der medizinischen Chemie. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung hochdosierte Aerosolformulierungen aus Cyclosporin A-Liposomen.

**BESCHREIBUNG DES EINSCHLÄGIGEN FACHGEBIETS**

**[0002]** In der Lunge sind viele verschiedene Erkrankungen unter Verwendung von Aerosolabgabesystemen erfolgreich behandelt worden, die dazu dienen, Medikamente direkt auf die Lungenoberfläche aufzubringen. Für eine derartige Abgabe hat man eine Vielzahl von Vorrichtungen entwickelt (z. B. Inhalatoren mit bemessener Dosis und Inhalatoren für Trockenpulver). Strahlzerstäuber wurden klinisch für die Aerosolabgabe von wasserlöslichen Medikamenten und Suspensionen von feinst zerkleinerten Stoffen verwendet, bei wasserunlöslichen, hydrophoben Verbindungen ist deren Verwendung jedoch begrenzt.

**[0003]** Durch die Entwicklung von Liposomenformulierungen, die mit der Aerosolabgabe kompatibel sind, können weitere Medikamente mit Strahlzerstäubern verabreicht werden. Die Verwendung von Liposomen für die Aerosolabgabe hat viele Vorteile. Dazu gehören die Kompatibilität mit Wasser, die verzögerte Freisetzung in der Lunge, die die Beibehaltung von therapeutischen Werten des Medikaments ermöglicht; und außerdem erleichtern Liposomen die intrazelluläre Zuführung, insbesondere an alveoläre Makrophagen.

**[0004]** Die Wirksamkeit einer örtlichen, topischen Therapie mittels Aerosolen wird durch die Menge des Medikaments bestimmt, die den Stellen einer Erkrankung in der Lunge zugeführt wird; und es gibt einige unterschiedliche Schlüsselparameter, die die Zufuhrmenge und somit die therapeutische Wirksamkeit von Aerosolformulierungen bestimmen. Zum Beispiel stellen die Gestaltung und Abänderung des Zerstäubers, die Arbeitsbedingungen (z. B. die Strömungsrate) und das Vorhandensein einer Hilfsausrüstung (Schlauch, Verbindungen, Mundstücke, Gesichtsmasken und dergleichen) wichtige Variable dar.

**[0005]** Folglich kann der Wirkungsgrad des Aerosolausstoßes durch eine passende Ergänzung der geeigneten Zerstäubervorrichtung verbessert werden. Eine ungeeignete Ergänzung der Vorrichtung und/oder nicht perfekte Parameter können die inhalierten Dosen, die Stellen der Zuführung und das therapeutische Ergebnis beeinflussen.

**[0006]** Die Formulierung des Medikaments stellt ebenfalls einen kritischen Faktor dar, der den Wirkungsgrad des Aerosolausstoßes und die aerodynamischen Eigenschaften von Medikament-Liposomen regelt. Es wurde festgestellt, daß der Wirkungsgrad des Ausstoßes von Medikament-Liposomen durch die Verwendung von Liposomen verbessert werden kann, die mit niedrigen Phasenübergangstemperaturen formuliert sind (siehe Waldrep et al., J. of Aerosol Med. 7 : 1994 (1994) und Waldrep et al., Int'l J. of Pharmaceutics 97: 205–12 (1993)).

**[0007]** Ein weiteres Verfahren zur Erhöhung des Aerosolausstoßes von Medikament-Liposomen besteht in der Erhöhung der Vorratskonzentrationen von Medikament und Phospholipid. Das Zerstäuben einiger Medikament-Liposomenformulierungen mit mehr als 50 mg/ml führt zum Verstopfen der Zerstäuberdüsen; es wurden sogar unbeladene Liposomenformulierungen mit bis zu 150 mg/ml erfolgreich zerstäubt (siehe Thomas, et al., Chest 99: 1268–70 (1991)).

**[0008]** Zudem wird die Aerosolleistung (Ausstoß und Partikelgröße) teilweise von den physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie Viskosität und Oberflächenspannung, beeinflußt. Diese Variablen beeinflussen die maximalen Medikament-Liposomen-Konzentrationen, die mit der Aerosolabgabe mittels Strahlzerstäubern kompatibel sind.

**[0009]** Entzündungshemmende Glucocorticoide werden seit mehr als 40 Jahren für die Behandlung von Asthma und anderen schweren entzündlichen Erkrankungen der Lunge verwendet. Seit kurzem wird eine Therapie mit Glucocorticoid-Aerosolen in zunehmendem Maße als Verabreichungsweg angewendet. Gegenwärtig gibt es einige verschiedene, obwohl strukturell ähnliche, topisch aktive Glucocorticoide – z. B. Beclomethason, Budesonid, Flunisolid, Triamcinolonacetonid und Dexamethason – die in Inhalatoren mit einer bemessenen Dosis oder Inhalatoren für Trockenpulver zur Aerosolbehandlung von Asthma und anderen entzündlichen Erkrankungen zur Verfügung stehen.

**[0010]** Obwohl systemische Komplikationen, wie eine Störung der hypothalamisch-hypophysären Achse,

eine Kataraktbildung und eine Wachstumshemmung, bei mit inhalieren Glucocorticoiden behandelten Asthmatikern selten auftreten, sind örtliche Nebenwirkungen in Form von Candidiasis und Dysphonie häufiger, so daß die Verwendung zusätzlicher Zwischenstücke erforderlich wird. Gegenwärtig sind in den Vereinigten Staaten von Amerika keine Glucocorticoidformulierungen für die Verabreichung durch Zerstäubung zugelassen, obwohl in Europa und Kanada Suspensionen von feinst zerkleinertem Beclomethason und Budesonid verwendet werden.

**[0011]** Die US 5 049 388 beschreibt wäßrige Aerosoltropfen, die ein Liposom enthalten, das mit einem Medikament, z. B. Cyclosporin A, in Wechselwirkung steht, die mit einem Durchmesser von weniger als 5 µm und einem massegemittelten aerodynamischen Durchmesser im Bereich von 1 bis 3 µm in einer kontinuierlichen Phase aus Luft oder Sauerstoff bereitgestellt werden.

**[0012]** Dieses Dokument offenbart, daß die Dosis unter anderem durch die Konzentration des Medikament-Liposomen-Präparats im Aerosolerzeuger reguliert wird, die im Bereich von 10 bis 40 mg/ml des Medikament-Liposomen-Präparats liegt (das ist die gesamte Konzentration von sowohl Liposomen als auch Medikament). Die US 5 049 388 legt es nicht nahe, daß für irgendeine der offenbarten Kombinationen von Medikament-Liposomen eine höhere zugrundeliegende Vorratskonzentration eingestellt werden kann.

**[0013]** Die WO 96/19199 beschreibt eine Proliposomenzusammensetzung mit einem Medikament, z. B. Cyclosporin A, und einem Phospholipid mit einer Phasenübergangstemperatur unterhalb von 37°C, so daß sie unter physiologischen Bedingungen hydratisiert werden kann, in einem Trockenpulver, das den Atemwegen mittels eines Inhalators zugeführt wird. Das Proliposom wird nach der Inhalation über den Inhalator für Trockenpulver oder vor der Abgabe aus einem unter Druck stehenden Aerosolinhalator in den Atemwegen hydratisiert. Die Proliposomen werden nicht zerstäubt und können im Aerosol zu Partikeln mit bis zu 1 mm aggregieren.

**[0014]** Die EP-A-0 267 050 beschreibt ein Aerosol aus Medikament-Liposomen, aus dem durch Zerstäuben das zerstäubte Aerosol aus Medikament-Liposomen erzeugt kann, das in der WO 96/19199 beschrieben ist. Die EP-A-0 267 050 offenbart jedoch weder Cyclosporin A noch Budesonid als Medikamente, die in das Liposom eingeführt werden können.

**[0015]** Waldrep et al. (1993) Int. J. Pharmaceutics Bd. 97 Abstract Nr. 02181677 vergleicht die Eigenschaften von Aerosolen von Beclomethasondipropionat-DPLC-Liposomen, die von verschiedenen handelsüblichen Strahlzerstäubern erzeugt wurden, um zu bestimmen, ob irgendwelche davon oder alle Aerosole mit Eigenschaften erzeugen, die für die Abgabe von Medikament-Liposomen vorteilhaft sind, zum Beispiel einen massegemittelten aerodynamischen Durchmesser von 1 bis 3 µm.

**[0016]** Waldrep et al. beschreibt, daß mit den Vorrichtungen, die in diesem Dokument offenbart sind, Aerosole von Budesonid-Lipid erzeugt werden können; durch den Stand der Technik zum Zeitpunkt dieses Dokumentes ist jedoch die Vorratskonzentration begrenzt, und es wird kein Vorschlag gemacht, diese Vorratskonzentration zu erhöhen.

**[0017]** Die vorliegende Erfindung betrifft konzentrierte hochdosierte Aerosolformulierungen aus Cyclosporin A-Liposomen, die bei Bereichen der Partikelgröße im optimalen Bereich des massegemittelten aerodynamischen Durchmessers (MMAD) mit 1 bis 3 µm einen maximalen Aerosolausstoß liefern. Im Stand der Technik gibt es keine derartigen Aerosolformulierungen aus Liposomen. Die vorliegende Erfindung erfüllt den Bedarf und die Forderung, die auf diesem Fachgebiet schon lange bestehen.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0018]** Die vorliegende Erfindung gibt eine hochdosierte Aerosolzusammensetzung aus Liposomen von Cyclosporin A (CsA) an, die bis zu etwa 30 mg/ml Cyclosporin A in bis zu etwa 225 mg eines Phospholipids/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration aufweist.

**[0019]** In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wird eine hochdosierte Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen angegeben, die bis zu etwa 20 mg/ml Cyclosporin A in bis zu etwa 150 mg Dilauryolphosphatidyl-Cholin (DLPC)/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration aufweist.

**[0020]** In einem besonders bevorzugten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wird eine hochdosierte Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen angegeben, die bis zu etwa 21,3 mg/ml Cyc-

losporin A in bis zu etwa 160 mg Dilauryolphosphatidyl-Cholin (DLPC)/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration aufweist. In der hochdosierten CsA-Liposomenformulierung kann das DLPC durch andere Phospholipide ersetzt werden.

**[0021]** Andere und weitere Gesichtspunkte, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden anhand der folgenden Beschreibung der gegenwärtig bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung deutlich, die zum Zwecke der Offenbarung aufgeführt sind. Es muß darauf hingewiesen werden, daß auf den folgenden Seiten irgendein Bezug auf Budesonid-Liposomenpräparate ein Vergleich und nicht Teil der Erfindung ist.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGSFIGUREN

**[0022]** Somit können die Möglichkeiten, mit denen die vorstehend genannten Merkmale, Vorteile und Aufgaben dieser Erfindung erreicht bzw. gelöst werden und detailliert verständlich gemacht werden, insbesondere die vorstehend kurz zusammengefaßte Beschreibung der Erfindung, unter Bezugnahme auf bestimmte Ausführungsbeispiele beschrieben werden, die in den zugehörigen Zeichnungsfiguren erläutert sind. Diese Zeichnungsfiguren bilden einen Teil der Beschreibung. Es ist jedoch selbstverständlich, daß die beigefügten Zeichnungsfiguren bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung erläutern.

**[0023]** [Fig. 1](#) zeigt das Profil der Aerosolverteilung von hochdosierten und niedrigdosierten Formulierungen von Cyclosporin A-DLPC-Liposomen, die mit einem Zerstäuber Aerotech II mit einer Strömungsrate von 10 l/min zerstäubt wurden, wie es mit dem Andersen-Kaskadenimpaktor bestimmt wurde. Die Werte (Durchschnittswert  $\pm$  Standardabweichung) geben den anteiligen Prozentsatz des gesamten Cyclosporins A, das in jeder Stufe des Impaktors gewonnen wurde, mit der zugehörigen Größentrennung in  $\mu\text{m}$  an ( $n = 3$  Analysen). Die massegemittelten aerodynamischen Durchmesser (MMAD) und die geometrischen Standardabweichungen (GSD) wurden mit einer Kurve der logarithmischen Wahrscheinlichkeit berechnet.

**[0024]** [Fig. 2](#) zeigt das inhalierte Cyclosporin A aus hochdosierten und niedrigdosierten Formulierungen von Cyclosporin A-DLPC-Liposomen, die mit einem Zerstäuber Aerotech II mit einer Strömungsrate von 10 l/min zerstäubt wurden, wie es bei einem Simulationsmodell der menschlichen Lunge bestimmt wurde. Die Werte geben das Cyclosporin A an, das zu unterschiedlichen Zerstäubungszeitpunkten mit Filtern, die an einen Harvard-Respirator angebracht waren, der bei einem Wechselvolumen (TV) von 500 ml und einer Rate von 15 Atemzügen pro Minute (BPM) eingestellt worden war, aus Aerosolproben aufgefangen wurde.

**[0025]** [Fig. 3](#) zeigt das Profil der Aerosolverteilung von hochdosierten und niedrigdosierten Formulierungen von Budesonid-DLPC-Liposomen, die mit einem Zerstäuber Aerotech II mit einer Strömungsrate von 10 l/min zerstäubt wurden, wie es mit dem Andersen-Kaskadenimpaktor bestimmt wurde. Die Werte (Durchschnittswert  $\pm$  Standardabweichung) geben den anteiligen Prozentsatz des gesamten Cyclosporins A, das in jeder Stufe des Impaktors gewonnen wurde, mit der zugehörigen Größentrennung in  $\mu\text{m}$  an ( $n = 3$  Analysen). Die massegemittelten aerodynamischen Durchmesser (MMAD) und die geometrischen Standardabweichungen (GSD) wurden mit einer Kurve der logarithmischen Wahrscheinlichkeit berechnet.

**[0026]** [Fig. 4](#) zeigt das Budesonid, das aus hochdosierten und niedrigdosierten Formulierungen von Budesonid-DLPC-Liposomen inhaliert wurde, die mit einem Zerstäuber Aerotech II mit einer Strömungsrate von 10 l/min zerstäubt wurden, wie es mit einem Simulationsmodell der menschlichen Lunge bei einem Wechselvolumen (TV) von 500 ml und 15 Atemzügen pro Minute (BPM) bestimmt wurde. Die Werte geben das Budesonid an, das zu unterschiedlichen Zerstäubungszeitpunkten mit Filtern, die an einem Harvard-Respirator angebracht waren, der bei einem Wechselvolumen (TV) von 500 ml und einer Rate von 15 Atemzügen pro Minute (BPM) eingestellt worden war, aus Aerosolproben aufgefangen wurde.

**[0027]** [Fig. 5](#) zeigt den Zeitrahmen von simulierten CsA-Konzentrationen, die aus zerstäubten Liposomen- und Cremophor-Formulierungen inhaliert wurden. Es sind CsA-Cremophor (50 mg/ml, Kreise), CsA-DLPC (5 mg/ml, volle Dreiecke) und CsA-DLPC (20 mg/ml, Rauten) graphisch aufgetragen.

**[0028]** [Fig. 6](#) zeigt die Konzentration von CsA in der Lunge im Verlauf der Inhalationszeit bei ICR-Mäusen (35 g) nach der Inhalation einer zerstäubten hohen Dosis von CsA-DLPC (20 mg/ml).

**[0029]** [Fig. 7](#) zeigt die entzündungshemmende Wirkung einer hohen Dosis von Bud-DLPC auf Leukocyten einer bronchiolaralveolären Spülung (BAL) der Lunge als Reaktion auf eine Anregung mit LPS (Endotoxin).

**[0030]** [Fig. 8](#) zeigt eine Gradientenanalyse über Perkoll von Bud-DLPC-Liposomen.

**[0031]** [Fig. 9](#) zeigt den DLPC-Aerosolausstoß (mg/min) von zerstäubten unbeladenen DLPC-, CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen. Die Aerosole wurden mit mit Wasser getesteten und standard-isierten Zerstäubern Aerotech II erzeugt (anfängliches Ausgangsvolumen 5 ml; Strömungsrate 10 l/min), und Probenpaare wurden bei 4 bis 5 und 6 bis 7 Minuten der Zerstäubung in Aufprallvorrichtungen AGI-4 aufgefangen. Die DLPC-Konzentrationen wurden durch HPLC-Analyse bestimmt. Die aufgeführten Werte sind für Formulierungen repräsentativ, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurden, und sind gegenüber dem ursprünglichen DLPC-Gehalt der Liposomen (mg/ml) graphisch aufgetragen.

**[0032]** [Fig. 10](#) zeigt den Massenausstrag (g/min) von zerstäubten unbeladenen DLPC-, CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen. Die Aerosole wurden mit mit Wasser getesteten und standardisierten Zerstäubern Aerotech II erzeugt (anfängliches Ausgangsvolumen 5 ml; Strömungsrate 10 l/min), und der Masseausstoß wurde nach 10 min Zerstäubung mit einer analytischen Waage bestimmt. Die aufgeführten Werte sind für Formulierungen repräsentativ, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurden, und sind gegenüber dem ursprünglichen DLPC-Gehalt der Liposomen (mg/ml) graphisch aufgetragen.

**[0033]** [Fig. 11](#) zeigt den CsA- und Bud-Aerosolausstoß (mg/min) von zerstäubten CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen. Die Aerosole wurden mit mit Wasser getesteten und standardisierten Zerstäubern Aerotech II erzeugt (anfängliches Ausgangsvolumen 5 ml; Strömungsrate 10 l/min), und Probenpaare wurden bei 4 bis 5 und 6 bis 7 Minuten der Zerstäubung in Aufprallvorrichtungen AGI-4 aufgefangen. Die Medikamentenkonzentrationen wurden durch HPLC-Analyse aus aliquoten Probenmengen bestimmt, die ebenfalls auf den DLPC-Gehalt analysiert wurden ([Fig. 1](#)). Die aufgeführten Werte sind für Formulierungen repräsentativ, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurden, und sind gegenüber dem anfänglichen Medikamentengehalt des Liposoms (mg/ml) graphisch aufgetragen.

**[0034]** [Fig. 12](#) zeigt eine Analyse der Viskosität (Zentipoise) von unbeladenen DLPC-, CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen (anfängliches Ausgangsvolumen 10 ml; Raumtemperatur). Die aufgeführten Werte sind der Durchschnittswert von 10 Beobachtungen bei jeder Formulierung, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurde, und sind gegenüber dem anfänglichen DLPC-Gehalt des Liposoms (mg/ml) graphisch aufgetragen.

**[0035]** [Fig. 13](#) zeigt eine Analyse der Oberflächenspannung (dyn/cm) von unbeladenen DLPC-, CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen (anfängliches Ausgangsvolumen 7 ml; Raumtemperatur). Die aufgeführten Werte sind der Durchschnittswert von 10 Beobachtungen für jede Formulierung, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurde, und sind gegenüber dem anfänglichen DLPC-Gehalt des Liposoms (mg/ml) graphisch aufgetragen. Es wurde auch die Viskosität der Proben analysiert.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0036]** Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, den Wirkungsgrad bei der Abgabe einer hochdosierten Aerosolzusammensetzung aus Liposomen einer pharmazeutischen Verbindung zu verbessern. Folglich zielt die vorliegende Erfindung auf einen besseren Wirkungsgrad bei der Abgabe eines Aerosols aus Cyclosporin A-Liposomen. Bei einer Reihe von Versuchen wurde festgestellt, daß der Medikamentenausstoß bei einem Aerosol durch die Verwendung von Liposomen, die mit niedrigen Phasenübergangstemperaturen formuliert sind, wie DLPC (das Seitenketten aus gesättigten Fettsäuren mit 12 Kohlenstoffatomen enthält), verbessert werden kann.

**[0037]** Es wurde auch festgestellt, daß bestimmte Zerstäuber den Aerosolausstoß von Medikament-Liposomen im gewünschten Größenbereich des massegemittelten aerodynamischen Durchmessers (MMAD) von 1 bis 3 µm verbessern. Die in diesen früheren Untersuchungen angewendete Konzentration von Cyclosporin A betrug 1,0 mg bei 7,5 mg DLPC/ml der zugrundeliegenden Lösung im Vorrat.

**[0038]** 1993 wurde die Notwendigkeit erkannt, den Aerosolausstoß von Cyclosporin A-Liposomen durch maßstabsgerechte Vergrößerung der Formulierung zu erhöhen. Dies konnte durch verschiedene Methoden, wie z. B. die Auswahl eines wirksameren Zerstäubers, erreicht werden. Der Aerosolausstoß von Cyclosporin A-Liposomen wurde durch eine Ergänzung des Zerstäubers Aerotech II (ATII) (von CIS-USA, Bedford, Mass.) maßstablich vergrößert. Dieser ATII hat gegenüber dem bisher verwendeten Puritan Bennett 1600 sj einen ungefähr 50% höheren Aerosolausstoß.

**[0039]** Ein zweites Verfahren zur Erhöhung des Aerosolausstoßes von Medikament-Liposomen bestand darin, die Vorratskonzentration des Medikaments und des Phospholipids in der Flüssigkeit des Vorrats des Zerstäubers zu erhöhen. Die Konzentration von Cyclosporin A-DLPC-Liposomen von 5 mg Cyclosporin A/37,5 mg DLPC pro ml wurde erfolgreich erhöht, wobei der gewünschte Aerosolausstoß mit einem massegemittelten aerodynamischen Durchmesser (MMAD) im Bereich von 1 bis 3 µm erreicht wurde.

**[0040]** Bei einem Modell für das Abscheiden in der menschlichen Lunge zeigte die Analyse dieses Aerosols, daß nach einer einzigen 15-minütigen Inhalation theoretisch ungefähr 3,2 mg Cyclosporin A in der Lunge abgeschieden werden. Untersuchungen der Universität von Pittsburgh bei einer Gruppe von Patienten mit einem allogenen Lungentransplantat, die mit einem Aerosol von Cyclosporin A (in Ethanol oder Propylenglycol gelöst) behandelt wurden, zeigten eine klinische Verbesserung (Umkehr der Abstoßung des Implantats), wenn der Lunge 20 mg Cyclosporin A zugeführt wurden. Mit dem verfügbaren System aus Cyclosporin A-DLPC-Liposomen ist eine etwa 2-stündige Inhalation des Aerosols erforderlich, um diese Menge zuzuführen.

**[0041]** Ein solcher langer täglicher Inhalationszeitraum wäre für den Patienten wahrscheinlich problematisch und erfordert acht Nachfüllungen des Vorrats des Zerstäubers. Deshalb war es erforderlich, die Konzentration von Cyclosporin A-DLPC im Vorrat zu erhöhen. Im Stand der Technik ist es jedoch allgemein bekannt, daß es unmöglich ist, mehr als 50 mg/ml Liposomen zu zerstäuben, da höhere Konzentrationen zum Verstopfen der Zerstäuberdüsen führen.

**[0042]** Mit der vorliegenden Erfindung ist es gelungen, eine Konzentration von 20 bis 30 mg/ml Cyclosporin A : 150 bis 225 mg DLPC/ml Ausgangsvorrat zu erreichen. Die Partikelgröße wurde durch diese Veränderung unbedeutend erhöht, wobei sich der MMAD des Aerosols von 1,6 µm auf 2,0 µm verändert hatte, wie es bei Cyclosporin A-DLPC (5 mg/37,5 mg) nachgewiesen wurde, ohne daß sich die GSD änderte ([Fig. 1](#)). Der Aerosolausstoß von "hochdosierten" 20 bis 30 mg Cyclosporin A-DLPC war deutlich höher als bei 5 mg Cyclosporin A-DLPC.

**[0043]** Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, betrug bei einem Modell zur Simulation der menschlichen Lunge, 15 Minuten mit hochdosiertem Cyclosporin A-DLPC, der erforderliche Zeitraum, um Patienten mit einem allogenen Lungentransplantat eine mutmaßlich therapeutische Dosis zuzuführen, etwa 45 Minuten oder weniger. Dieser Intervall basiert sicher auf Dosierungsergebnissen von anderen Forschern, die andere Aerosole von Cyclosporin A verwendeten. Da Cyclosporin A-Liposomen bei einer geringeren Dosis theoretisch wirksamer und weniger toxisch als Cyclosporin A in Ethanol oder Propylenglycol sind, wäre der Inhalationszeitraum wahrscheinlich viel kürzer. Eine Erhöhung von Cyclosporin A-DLPC auf mehr als etwa 30 mg Cyclosporin A – 225 mg DLPC erwies sich als unwirksam.

**[0044]** Die vorliegende Erfindung zeigt die Nützlichkeit eines hochdosierten Aerosols aus Cyclosporin A-DLPC-Liposomen im Bereich von 20 bis 25 mg Cyclosporin A/150 bis 200 mg DLPC pro ml; obwohl auch Mengen von bis zu 30 mg/ml eine hohe Dosis darstellen würden. In einer hochdosierten Cyclosporin A-Liposomenformulierung kann DLPC durch andere Phospholipide ersetzt werden. Zu repräsentativen Beispielen geeigneter Phospholipide gehören Phosphatidylcholid von Eigelb, Phosphatidylcholid von hydrierten Sojabohnen, Dimyristoylphosphatidylcholid, Dioleoyldipalmitoylphosphatidylcholid und Dipalmitoylphosphatidylcholid.

**[0045]** Ein hochdosiertes Aerosol aus Cyclosporin A-Liposomen erweist sich bei einer Vielzahl von immunologisch vermittelten Lungenkrankheiten, wie der Abstoßung eines Allotransplantats, Bronchiolitis obliterans, Allergie, Hyperempfindlichkeiten und Asthma, als vorteilhaft und zeigt sich mit unterschiedlichen Zerstäubersystemen bei Kindern, Erwachsenen und älteren Patienten als nützlich. Für die Behandlung verschiedener Einheitsbilder einer Krankheit sind unterschiedliche Inhalationszeiträume erforderlich.

**[0046]** Die Erzeugung von hochdosierten Cyclosporin A-DLPC-Liposomen ist vorteilhaft, da hochdosierte Aerosole von Cyclosporin A für die Behandlung von Abstoßungsvorgängen bei einem Lungentransplantat verwendet werden. Bei diesen Untersuchungen werden die Patienten mit zerstäubtem Cyclosporin A-Cremophor (50 mg Cyclosporin A/ml) behandelt. Wie in [Fig. 5](#) gezeigt, ist der Aerosolausstoß von Cyclosporin A-Liposomen (5 mg/ml und 20 mg/ml) deutlich höher.

**[0047]** Das Cyclosporin A-Cremophor ist stark reizend, dieses Aerosol hat jedoch einen gewissen klinischen Vorteil. Folglich sind die Cyclosporin A-Liposomen sogar besser, nachdem sie einmal bei ähnlichen Patienten getestet worden sind. Das Aerosol aus Cyclosporin A-DLPC-Liposomen ist auch bei der Behandlung von Asthma wirksam, wie es für das orale Cyclosporin A beschrieben wurde.

## Liposomenformulierung: Herstellung von hochdosierten Medikament-Liposomen

**[0048]** In der vorliegenden Erfindung wurde für die optimale Formulierung verschiedener Medikament-Liposomen ein Gefriertrocknungsverfahren entwickelt. Es wurde ermittelt, daß das optimale Gewichtsverhältnis zwischen Cyclosporin A und DLPC 1 : 7,5 beträgt. Um die maximale Konzentration zu bestimmen, die mit der Zerstäubung kompatibel ist, wurden Formulierungen für die Aerosolabgabe von 10 bis 30 mg Cyclosporin A mit 75 bis 225 mg DLPC mit dem optimalen Gewichtsverhältnis zwischen CsA und DLPC von 1 : 7,5 hergestellt. Es wurde festgestellt, daß Formulierungen, die 21,3 mg Cyclosporin A 160 mg DLPC enthielten, optimal waren, dies wurde anhand des Aerosolausstoßes und der Partikelgröße für die Inhalation eingeschätzt.

**[0049]** Für optimierte hochdosierte Cyclosporin A-Liposomen wurden 100 mg Cyclosporin A (Sandoz Pharmaceuticals or Chemwerth Chemical Company) mit 750 mg synthetischem  $\alpha$ -Lecithin, 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DLPC von Avanti Polar Lipids), gemischt. Beim Verarbeiten in einem warmen Raum bei 37°C wurden das Medikament/das DLPC unter Rühren in 20 ml tert.-Butanol gemischt, wie es bei Waldrep et al., Int'l J. of Pharmaceutics 97: 205–12 (1993) beschrieben ist.

**[0050]** Nach dem Mischen wurde das Gemisch aus Medikament/Lipid in Glasampullen pipettiert, sofort eingefroren und danach über Nacht gefriergetrocknet, um das t-Butanol zu entfernen, so daß ein Pulvergemisch zurückblieb. Multilamellare Liposomen wurden hergestellt, indem 10 ml hochreines Wasser oberhalb der Phasenübergangstemperatur ( $T_c$ ) bei 25°C zugesetzt wurden, so daß eine abschließende übliche Medikamentenkonzentration von 1 bis 30 mg Cyclosporin A : 7,5 bis 225 mg DLPC pro ml bereitgestellt wurde. Das Gemisch wurde bei diskontinuierlichem Mischen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so daß multilamellare vesikuläre Liposomen erzeugt wurden.

**[0051]** In einem anderen Ausführungsbeispiel kann diese Liposomenformulierung durch Rotationsverdampfung hergestellt werden. Es wurden aliquote Mengen entnommen, um die Medikamentenkonzentration durch HPLC zu bestimmen. Dieses einfache Verfahren zum Herstellen von Liposomen wurde ausgewählt, da es sich leicht maßstablich auf die Herstellung großer Chargen ausweiten läßt.

**[0052]** Nach dem Quellen wurde die Qualität dieser Liposomenpräparate in bezug auf die Größe und des Vorhandenseins von Kristallen des Medikamentes, sowohl vor als auch nach dem Zerstäuben, mit einem Mikroskop mit einem Okularteil geprüft. Die Assoziation von Medikament-Lipid (Wirksamkeit beim Einkapseln) wurde durch Gradientenanalyse über Perkoll bestimmt, wie es bei O'Riordan et al., J. of Aerosol Med., in einer Veröffentlichung (1996) beschrieben ist.

**[0053]** Eine Verringerung der Größe der hochdosierten multilamellaren vesikulären Medikament-Liposomenformulierungen von Cyclosporin A-DLPC war vor dem Zerstäuben nicht erforderlich, da die Medikament-Liposomen (ein heterogenes Ausgangsgemisch mit 2,2 bis 11,6  $\mu$ m nach dem Quellen) beim Zerstäuben (und den kontinuierlichen Rückfluß) durch die Scherkräfte weiter verkleinert werden, die durch das Ausstoßen durch die Ausstoßöffnung des Zerstäubers erzeugt werden. Der Größenbereich dieser Liposomen in Aerosoltropfen beträgt 271 bis 555 nm.

**[0054]** Wäßrige Partikel im Aerosol enthalten 1 bis einige Liposomen. Der Durchmesser der Liposomen ist geringer als der der wäßrigen Aerosolpartikel, in denen sie getragen werden (siehe Waldrep et al., Int'l J. of Pharmaceutics 97: 205–12 (1993)). Nach dem Quellen werden die Formulierungen innerhalb weniger Stunden für das Zerstäuben verwendet. Sterile Formulierungen können über Monate bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank aufbewahrt werden.

**[0055]** Für eine Formulierung von hochdosierten Budesonid-DLPC-Liposomen wurde das optimale Verhältnis zwischen Medikament und Lipid bestimmt, indem verschiedene Formulierungen bei Verhältnissen von Budesonid-DLPC von 1 : 1 bis 1 : 20 getestet wurden. Das Verhältnis (auf das Gewicht bezogen) von 1 : 15 wurde für eine hochdosierte Budesonid-DLPC-Formulierung als optimal ausgewählt. Die hochdosierte Formulierung wird hergestellt, indem 10 bis 150 mg Budesonid mit 150 bis 2250 mg DLPC gemischt werden (wie es vorstehend für Cyclosporin A-DLPC beschrieben ist).

**[0056]** Das Medikament/das DLPC wurden unter Rühren in 20 ml tert.-Butanol gemischt, wobei in einem warmen Raum bei 37°C gearbeitet wurde. Nach dem Mischen wurde das Medikament/Lipid-Gemisch in Glasampullen pipettiert, schnell eingefroren und danach über Nacht gefriergetrocknet, um tert.-Butanol zu entfernen,



so daß ein Pulvergemisch zurückblieb.

**[0057]** Multilamellare Liposomen wurden hergestellt, indem 10 ml hochreines Wasser oberhalb der Phasenübergangstemperatur ( $T_c$ ) bei 25°C zugesetzt wurden, so daß eine abschliessende übliche Medikamentenkonzentration von 1 bis 15 mg Budesonid : 15 bis 225 mg DLPC pro ml Lösung bereitgestellt wurde. Das Gemisch wurde bei diskontinuierlichem Mischen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so daß multilamellare vesikuläre Liposomen hergestellt wurden. Für die Bestimmung der Medikamentenkonzentration durch HPLC wurden aliquote Mengen entnommen.

**[0058]** In einer anderen Ausführungsform kann diese Liposomenformulierung durch Rotationsverdampfung hergestellt werden. [Fig. 8](#) zeigt die Gradientenanalyse über Perkoll von Bud-DLPC-Liposomen (siehe O'Riordan et al., J. of Aerosol Med., in einer Veröffentlichung (1996)). Nach dem Quellen waren die multilamellaren vesikulären Budesonid-DLPC-Liposomen einige Wochen bei Raumtemperatur stabil. Sterile Präparate waren über Monate stabil. Als Konservierungsmittel kann Benzalkoniumchlorid (10 mg/l) zugesetzt werden.

## BEISPIEL 2

### Liposomen-Aerosole: Behandlung mit einem Aerosol aus Medikament-Liposomen

**[0059]** Für die Herstellung von Aerosolen aus Medikament-Liposomen wurde der Zerstäuber Aerotech II (CIS-USA, Bedford USA) verwendet, obwohl auch andere handelsübliche Zerstäuber verwendet werden können. Der ATII ist ein wirksamer Zerstäuber mit hohem Ausstoß, der gezeigt hat, daß er Aerosole von Liposomen im optimalen Größenbereich von 1 bis 3 µm MMAD für die Abgabe an die Lungenperipherie produzieren kann (siehe Vidgren, et al., Int'l of Pharmaceutics 115: 209–16 (1994)).

**[0060]** Dem Zerstäuber wurde Trockenluft aus einem Vorrat zugeführt, und seine interne Trockenluftaufnahme über einen regulierten Durchflußmesser betrug 10 l/min. Ein anfängliches Vorratsvolumen von 5 ml ist für 15 bis 20 Minuten Aerosol ausreichend. Längere Behandlungszeiträume würden das Nachfüllen des Vorrats erfordern.

## BEISPIEL 3

### Partikelgrößenverteilung eines Aerosols aus Medikament-Liposomen

**[0061]** Die aerodynamische Messung der Partikelgröße von Aerosolen aus Medikament-Liposomen erfolgte, wie es bei Waldrep et al., J. of Aerosol Med. 7: 1994 (1994) beschrieben ist, wobei ein Probennehmer für die Partikelgrößenbestimmung in einer nicht-praktikablen Umgebung, Andersen 1 ACFM (Graseby Andersen Instruments Inc., Atlanta, GA), als Simulator für die menschliche Lunge verwendet wurde (Andersen). Die vom Zerstäuber ATII erzeugten Aerosole aus Medikament-Liposomen wurden mit einer Vakuumpumpe (1 ACFM) aufgefangen, indem man sie bei jedem Versuch in einem üblichen Intervall für das Probenziehen von 0,5 Minuten auf acht Aluminiumkaskaden aufprallen ließ.

**[0062]** Medikamentenkonzentrationen in den Aerosoltropfen mit einer Größe von 0 µm bis 10 µm wurden in jeder Kaskade aufgefangen (0 = 9,0 µm bis 10,0 µm; 1 = 5,8 µm bis 9,0 µm; 2 = 4,7 µm bis 5,8 µm; 3 = 3,3 µm bis 4,7 µm; 4 = 2,1 µm bis 3,3 µm; 5 = 1,1 µm bis 2,1 µm; 6 = 0,65 µm bis 1,1 µm; 7 = 0,43 µm bis 0,65 µm) und nach dem Eluieren mit 10 ml Ethanol oder Methanol und durch HPLC-Analyse bestimmt. Eine künstliche Verengung gemäß USP, die an der Einlaßöffnung des Impaktors angebracht war, diente dazu, einige wenige Aerosolpartikel zu entfernen, die größer als 10 µm waren. Die letzte Stufe verwendete einen Sammelfilter aus Glasfasern.

**[0063]** Nachdem die Medikamentenkonzentrationen für jede Kaskade durch HPLC bestimmt worden waren, wurden der massegemittelte aerodynamische Durchmesser (MMAD) und die geometrische Standardabweichung (GSD) der Medikament-Liposomen auf einer Skala der logarithmischen Wahrscheinlichkeit mit dem wirksamen Trenndurchmesser als Ordinate und dem kumulativen Prozentsatz unterhalb des Größenbereichs (anhand der Konzentration) als Abszisse berechnet (KaleidaGraph 3.0).

**[0064]** Der MMAD und die GSD werden anhand des Medikamentengehalts der Liposomen bestimmt, die in der Gruppe von Tropfen verteilt sind, aus denen das Aerosol besteht (siehe Waldrep et al., Int'l J. of Pharmaceutics 97: 205–12 (1993)). Statt der Liposomengröße bestimmte die Gruppe von Tropfen den MMAD und die GSD. Die Gültigkeit dieser Methode für die Berechnung des MMAD und der GSD wurde unabhängig davon



mit dem Laser Aerosol Particle Sizer, Modell 3300 TSI bestätigt.

#### BEISPIEL 4

##### Schätzung der inhalierten Dosis

**[0065]** Für die Bestimmung der geschätzten inhalierten Dosis von Bec-DLPC-Liposomen wurden zerstäubte Proben in einem System zur Simulation der menschlichen Lunge aufgefangen, wie es bei Smaldone et al., Am Rev Respir Dis 143: 727–37 (1991) beschrieben ist. Mit einem Harvard Respirator wurden Aerosolproben aus dem Zerstäuber ATII (Strömungsrate 10 l/min) auf Whatman-Filtern GF/F aufgefangen, wobei 15 Atemzüge pro Minute bei Wechselvolumina von 500 ml angewendet wurden.

**[0066]** Dieses grundsätzliche Wechselvolumen von 500 für Männer (450 für Frauen) wurde aus einem Nomo-gramm bestimmt, das für die Atemfrequenz, das Gewicht und das Geschlecht eingestellt worden war. Die Aerosolproben wurden innerhalb eines Zerstäubungszeitraums von 15 Minuten aufgefangen. Die auf den Filtern abgelagerte Menge von Cyclosporin A oder Budesonid wurde nach dem Herauslösen durch HPLC-Analyse bestimmt.

#### BEISPIEL 5

##### Analyse von pulmonärem Cyclosporin A: Festphasenextraktion

**[0067]** Es wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 1.) Lungengewebe der Maus wurde nach der Inhalation eines Aerosols aus Cyclosporin A-DLPC-Liposomen erhalten. Es wurde ein interner CSD-Standard mit 10 µg (10 µl eines Ansatzes mit 10 mg/ml) zugesetzt. Das Gewebe wurde entweder in einem Mischer oder in Wig-L-Bug-Röhrchen homogenisiert (wobei 4 bis 5 Kugeln pro Röhrchen verwendet wurden).
- 2.) Das homogenisierte Gewebe wurde für 1 bis 2 Minuten in 1 ml hochreinem Wasser extrahiert. Diese Volumina gelten für eine Gewebeprobe und werden verdünnt, wenn mehr als eine Gewebeprobe gesammelt wird.
- 3.) 2 ml 98% Acetonitril/2% Methanol wurden zugesetzt, und die Probe wurde unter Ausbildung eines Wirbels gerührt.
- 4.) Die Probe wurde für 20 Minuten mit voller Geschwindigkeit zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein sauberes Röhrchen gegeben und für 10 Minuten mit voller Geschwindigkeit zentrifugiert.
- 5.) Der Überstand wurde aufgefangen, und auf jeweils 1 ml, die bei der Gewebeextraktion verwendet wurden, wurden 5 ml hochreines Wasser zugesetzt.
- 6.) Es wurde eine Säule Sep-Pak C18 (Waters Sep-Pak Light für Gewebe einer einzigen Maus) vorbereitet und mit 5 ml 95%igem Ethanol und 5 ml hochreinem Wasser gewaschen. Die Probe wurde langsam zugesetzt und mit 5 ml hochreinem Wasser und 5 ml 50%-igem Acetonitril gewaschen.
- 7.) Das Eluat wurde in ein Auffangröhrchen gegeben und mit 1 ml Methanol und danach mit 0,5 ml Wasser eluiert.
- 8.) Verunreinigungen wurden entfernt, indem das Eluat zweimal mit 1,5 ml Hexan gewaschen wurde und die obere Schicht weggegossen wurde.
- 9.) Das extrahierte Eluat wurde bis zur Trockne verdampft, wobei die Temperatur des Reaktionsverdampfers bei einem minimalen Luftstrom auf einen niedrigen Wert eingestellt wurde.
- 10.) Die Wiederherstellung erfolgte in 0,3 ml mobile Phase CsA und einer Probe durch HPLC.

#### BEISPIEL 6

##### Analyse des Medikaments durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC: Analyse von Budesonid)

**[0068]** Die HPLC-Analyse diente mehreren Zwecken, um folgendes zu bestimmen: den Budesonidgehalt von Liposomenformulierungen, den Wirkungsgrad beim Einkapseln und den Budesonidgehalt von Aerosolproben, die mit dem Lungensimulator erhalten worden waren. Die Budesonidkonzentrationen wurden durch HPLC-Analyse mit dem automatischen Probennehmer Waters WISP 717 und einer Säule Waters Nova-Pak C18 (3,9 × 150 mm) bei Raumtemperatur bestimmt.

**[0069]** Die Messung des Peaks erfolgte bei 238 nm mit einem variablen Detektor für UV/sichtbare Wellenlänge bei quantitativer Erfassung mit einem Millennium 2010 Chromatography Manager von Waters, Version 2.15.

Die für diese Untersuchungen verwendete mobile Phase war Ethanol/Wasser mit 50 : 50 bei einer Strömungsrate von 0,6 ml/min (siehe Andersson & Ryrfeldt, J. Pharm Pharmacol 36: 763–65 (1984)). Die Proben für die Analyse wurden direkt in Ethanol gelöst (um die Liposomen zu lösen). Medikamentenstandards wurden aus Ethanolstammlösungen hergestellt, die bei –80°C aufbewahrt wurden.

## BEISPIEL 7

Medikamentenanalyse durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC): Analyse von Cyclosporin A

**[0070]** Das Cyclosporin A in den Liposomenformulierungen (um den Gehalt an Cyclosporin A und den Wirkungsgrad beim Einkapseln zu bestimmen) und in Aerosolproben wurde durch HPLC bestimmt. Bei dieser Analyse wurden ein automatischer Probeninjektor WISP von Waters (Milford, MA) und die Säule Supelco LC-1, die auf 75°C erwärmt worden war, verwendet. Die mobile Phase war 50% Acetonitril, 20% Methanol und 30% Wasser (siehe Charles et al., Ther. Drug Monitor. 10: 97–100 (1988)).

**[0071]** Die Peaks wurden bei 214 nm erfaßt, wobei ein variabler Wellenlängendetektor verwendet wurde, und mit dem Millennium 2010 Chromatography Manager von Waters, Version 2.15 mengenmäßig erfaßt. Die Proben für die Analyse wurden direkt in Methanol gelöst (um die Liposomen zu lösen). Medikamentenstandards wurden aus Methanolstammlösungen hergestellt, die bei –80°C aufbewahrt wurden.

## BEISPIEL 8

Medikamentenanalyse durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC: DLPC-Analyse

**[0072]** Es wurde eine Modifikation des HPLC-Protokolls von Grit und Commelin, Chem. & Phys. of Lipids 62: 113–22 (1992) angewendet. Ein automatischer Probeninjektor 717 WISP von Waters und eine Amino-Säule Spherisorb S5 (25 cm × 4,6 mm, 5 µm) wurde mit Acetonitril, Methanol und 10 mM Ammonium/Trifluoressigsäure, pH = 4,8 (64 : 28 : 8, Vol. : Vol. : Vol.) als mobile Phase verwendet. Die Peaks wurden mit einem Verdampfungs-Massendetektor (SEDEX 55, Sedre, Frankreich) erfaßt und mit dem Millennium 2010 Chromatography Manager von Waters, Version 2.15 mengenmäßig erfaßt. Die Proben für die Analyse wurden direkt in Ethanol oder Methanol gelöst (um die Liposomen zu lösen).

## BEISPIEL 9

Lungenmodelle für den Medikament-Test bei Mäusen: Untersuchung einer akuten Entzündung: LPS (Bronchiolare Spültechnik)

**[0073]** Ein gram-negatives Zellwand-Lipopolysaccharid (LPS) diente dazu, bei Mäusen reproduzierbar eine akute Lungenentzündung hervorzurufen. Ein 10-minütiger Einwirkungszeitraum des Aerosols E. coli 055:B5 LPS (Sigma), das durch den Zerstäuber PBsj 1600 (Vorratskonzentration 100 µg/ml, zugeführte Dosis 60 ng) erzeugt worden war, leitete eine starke phlogistische Reaktion ein, die durch die Ansammlung von PMN in den Alveolen als Reaktion auf die Wirkung von chemotaktischen Cytokinen bestimmt wurde (bei 3 Stunden nachweisbar; maximale Reaktion bei 6 Stunden nach dem Stimulus).

**[0074]** Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Einfluß des LPS-Aerosols wurden die Mäuse durch Anästhesie mit Methoxyfluran getötet und man ließ das Blut durch die abdominale Aorta ablaufen. Die Luftröhre wurde chirurgisch freigelegt, und es wurde eine Kanüle mit einem PE50-Schlauch gelegt (Außendurchmesser 0,965 mm, Clay Adams). Unter Verwendung eines Gesamtvolumens von 2,0 ml ausgeglichener Hank'scher Salzlösung (HBSS; Ca/Mg-frei mit EDTA) wurden die Lungen fünfmal mit einem Volumen von etwa 1,0 ml gespült.

**[0075]** Die Ausbeute lag typischerweise bei einer Gewinnung von 85% des Spülfluids. Die resultierenden Leukocyten wurden mit einem Hämocytometer gezählt, cytozentrifugiert und gefärbt. Aus der unterschiedlichen Anzahl wurden die Effekte des Medikamenteffs anhand der Abnahme der Anzahl der Leukocyten und anhand der verringerten Anzahl von PMN und/oder gegenüber Myeloperoxidase positiven Zellen im Verhältnis zu den residenten Makrophagen und/oder gegenüber Myeloperoxidase negativen Zellen festgestellt.

**[0076]** Diese Analyse diente als Standard, um die biologische Aktivität eines Aerosolsystems aus Medikament-Liposomen durch die Abnahme des akuten entzündlichen zellulären Einflusses auf die Luftwege zu testen. [Fig. 7](#) zeigt den entzündungshemmenden Einfluß von hochdosiertem Bud-DLPC auf Leukocyten einer

bronchiolaralveolären Spülung (BAL) der Lunge als Reaktion auf eine Anregung mit LPC (Endotoxin).

## BEISPIEL 10

## Cytologie: Lungenspülung

**[0077]** Die Zell-Präps (Spülung, Thymocyten, Lymphknoten oder Splenocyten) wurden mit einem Hämocytometer gezählt, auf Objektträger cytozentrifugiert (wobei das Miles Cyto-Tek verwendet wurde) und mit Wright-Giemsa, May-Grunwald-Giemsa oder einer Leukocyten-Peroxidase-Färbung gefärbt, wobei dies von der Präparierung abhängt. Die unterschiedliche Anzahl wurde durch mikroskopische Beobachtung, in Öl eingetaucht, bestimmt. Die biologischen Effekte des Aerosolsystems aus Medikament-Liposomen wurden anhand der Verringerung der Gesamtzahl der Leukocyten und anhand der verringerten Anzahl von PMN oder gegenüber Myeloperoxidase positiven Zellen im Verhältnis zu den residenten Makrophagen festgestellt.

## BEISPIEL 11

in vitro Hemmung der von Antigen/Mitogen hervorgerufenen Lymphocyten-Blastogenese durch CsA, das nach der Zuführung eines Aerosols aus CsA-DLPC-Liposomen aus Lungengewebe der Maus abgetrennt wurde

Tabelle 1

| <u>Antigen/Mitogen</u> | <u>cpm, Durchschnittswert</u>                                | <u>Hemmung, %</u> |
|------------------------|--|-------------------|
| Medium                 | 2171   |                   |
| OVA                    | 13640  |                   |
| OVA + CsA 1 µg/ml      | 2173   | 99,9              |
| Medium                 | 517  |                   |
| ConA                   | 24341  |                   |
| ConA + CsA 1 µg/ml     | 3041   | 89,4              |
| OVA                    | Ovalbumin, 250 µg/ml;  |                   |
| ConA                   | Concanavlin A 1 µg/ml;                                       |                   |
| cpm                    | <sup>3</sup> HTdR-Zählungen pro Minute, Durchschnittswert 3. |                   |

Biologische Aktivität von CsA, das der Lunge mit einem Liposomen-Aerosol zugeführt wird

**[0078]** Für den Test wurde in mit dem Bronchiolus verbundenen, lymphoiden Geweben und mit der Lunge verbundenen Lymphknoten im Mediastinum eine primäre Immunreaktion erzeugt. Nach der örtlichen intranasalen Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit mit Alaun gefälltem Ovalbumin (AP-OVA (80 µg), mit dem Impfstoff Bordetella pertussis ergänzt) werden die Mäuse nach 7 Tagen getötet, das Mediastinum wird entfernt und die Lymphocyten werden für die in vitro Analyse abgetrennt.

**[0079]** Der Proliferationsassay besteht aus Veränderungen bei der Stimulierung von Lymphocyten nach der Aktivierung mit dem sensibilisierenden Antigen Ovalbumin oder mit dem nicht-spezifischen T-Zellmitogen, ConA plus gleichzeitige Kultur mit CsA, das durch Festphasenextraktion aus Lungengewebe der Maus abgetrennt und durch HPLC mengenmäßig erfaßt wurde.

**[0080]** Die Aufnahme von <sup>3</sup>[H]-TdR in die DNA wurde bei 48 bis 72 Stunden bestimmt. Die Hemmung einer spezifischen oder nicht-spezifischen Lymphocytenaktivierung wurde durch die Aufhebung oder Verringerung der Antigen-spezifischen Stimulierung oder bei der Hemmung der Ansprechempfindlichkeit auf Mitogene nachgewiesen.

## Physikalisch-chemische Analyse

## Oberflächenspannung und Viskosität

**[0081]** Die Oberflächenspannung (dyn/cm) wurde mit einem Tensiomat (Modell 21, Fisher Scientific, Indiana, PA) gemessen. Ein Platiniridiumring mit bekannter Abmessung wurde bei genau geregelten Bedingungen von der Oberfläche der zu testenden Flüssigkeit angehoben. Die vom Gerät abgelesenen "scheinbaren" Werte wurden mit einem Korrekturfaktor F multipliziert, der die Abmessungen des Meßrings, die Dichte der Flüssigkeit und andere Variable berücksichtigt (entsprechend den Vorschriften des Herstellers). Die Viskositätsmessungen erfolgten mit dem Kugelfallviskosimeter von Gilmont (Gilmont Instruments, Barrington, IL). Die Viskosität in Zentipoise wurde bei Raumtemperatur bestimmt.

## Größenmessungen der Medikament-Liposomen

**[0082]** Die Partikelgröße der Medikament-Liposomenlösungen wurden durch quasielastische Lichtstreuung mit dem Größenmeßgerät für Submikronpartikel Nicomp Modell 370 (Programmversion 5.0, Nicomp Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA) gemessen. Die in Wasser dispergierten Proben der Medikament-Liposomen wurden nach den Vorschriften des Herstellers analysiert, und die Werte wurden als nach der Intensität gewichtete Vesikelgröße angegeben. Der mittlere Partikeldurchmesser der Medikament-Liposomen wurde zuerst von Proben des Vorrats, nach 10 Minuten Zerstäubung, und bei Aerosolproben gemessen, die mit der Aufprallvorrichtung AGI-4 gewonnen worden waren, wie es bei Waldrep et al., Int'l J. of Pharmaceutics 97: 205–12 (1993) beschrieben ist.

**[0083]** Die Ergebnisse in [Fig. 9](#) (als DLPC-Konzentration graphisch aufgetragen) zeigen, daß ein erhöhter Aerosolausstoß von DLPC-Liposomen von bis zu 170 mg/ml bei einer Verringerung des Ausstoßes bei höheren Konzentrationen vorliegt. Eine Ausweitung dieser Daten auf CsA-DLPC-Liposomen erzielte ähnliche Ergebnisse bei einem maximalen Aerosolausstoß von Liposomen mit 21,3 mg CsA : 160 mg DLPC/ml ([Fig. 9](#)). Bei Bud-DLPC-Liposomen wurde der maximale Aerosolausstoß von DLPC bei einer Formulierung nachgewiesen, die aus 12,5 mg Bud : 187,5 mg DLPC/ml bestand. Eine Analyse des Austrags des flüssigen Trägers aus dem Zerstäuber, die in [Fig. 10](#) gezeigt ist (als DLPC graphisch aufgetragen) zeigt einen von der Konzentration abhängigen, geringeren Ausstoß, der durch die Masse bestimmt wird, die pro Minute als Aerosol gesprüht wird.

**[0084]** Bei zunehmenden Liposomenkonzentrationen gibt es eine ähnliche begleitende Zunahme des Aerosolausstoßes bis zu einem kritischen Punkt ([Fig. 11](#)) (als Medikamentenkonzentration graphisch aufgetragen). Messungen des Ausstoßes des als Aerosol gesprühten Medikaments aus CsA und Bud durch HPLC-Analyse zeigten maximale Konzentrationen für die Zerstäubung ([Fig. 11](#)). Bei CsA-DLPC-Liposomen lag der maximale Ausstoß bei 21,3 mg CsA : 160 mg/ml. Bei Bud-DLPC lag das Maximum bei 12,5 mg Bud : 187,5 mg DLPC. Die physikalisch-chemischen Analysen dieser Liposomenformulierungen zeigten eine parallele Zunahme der Viskosität (als DLPC-Konzentration graphisch aufgetragen) ([Fig. 12](#)).

**[0085]** Die Ergebnisse für DLPC, Bud-DLPC und CsA-DLPC waren ähnlich. Die Viskosität der Bud-DLPC-Formulierungen betrug etwa 20% weniger als die des unbeladenen DLPC allein. Die Viskosität von CsA-DLPC war durchweg die niedrigsten und zwischen 16 mg CsA/120 mg DLPC und 24 mg CsA/180 mg DLPC/ml unveränderlich. Diese Ergebnisse legen nahe, daß es für jede Formulierung eine maximale Viskosität gibt, die mit dem Ausstoß des zerstäubten Aerosols kompatibel ist; oberhalb dieses Schwellenwertes gibt es bei steigenden Medikament-Liposomen-Konzentrationen keinen zusätzlichen Ausstoß.

**[0086]** Die Ergebnisse in [Fig. 13](#) (als DLPC-Konzentration graphisch aufgetragen) zeigen, daß die Zugabe von CsA und Bud zu DLPC-Liposomen zu einer Verringerung der Oberflächenspannung der Formulierung führt. Die Verringerung der Oberflächenspannung war bis zu einem Punkt konzentrationsabhängig, wobei sie bei etwa 100 mg DLPC/ml ein Plateau erreichte. Es gab keinen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Aerosolausstoß der Liposomenformulierungen und der Oberflächenspannung. Mit zunehmender Konzentration der Liposomenformulierungen wurde jedoch zwischen der gemessenen Oberflächenspannung und Viskosität ein umgekehrter Zusammenhang festgestellt.

**[0087]** Die Analyse von Formulierungen von Medikament-Liposomen vor dem Zerstäuben durch quasielastische Lichtstreuung zeigte einen anfänglichen heterogenen Größenbereich von etwa 2,2 µm bis 11,6 µm (das liegt bei oder in der Nähe der oberen Genauigkeitsgrenze des Nicomp 370). Nach dem Zerstäuben wurden bei

jeder Formulierung minimale Unterschiede nachgewiesen. Der Größenbereich der Liposomen im Vorrat des Zerstäubers betrug 294 nm bis 502 nm, und Aerosolproben, die mit der Aufprallvorrichtung AGI-4 aufgefangen wurden, lagen im Bereich von 271 nm bis 555 nm.

**[0088]** Hochdosierte Formulierungen von Medikament-Liposomen, die aus 10 mg Bud : 150 mg DLPC und CsA 20 mg : DLPC 150 mg bestanden, wurden für weitere Aerosoluntersuchungen ausgewählt. Eine Analyse mit dem Andersen-Kaskadenimpaktor zeigte Werte von 2,0 µm MMAD/1,5 GSD für Bud-DLPC und 2,0 µm/1,8 für CsA-DLPC (Tabelle 2). Eine Analyse dieser Formulierungen in einem Modell zur Simulation der menschlichen Lunge bei 15 BPM und einem Wechselvolumen von 500 ml zeigte, daß ein 3-minütiger Inhalationszeitraum erforderlich wäre, um eine tägliche Dosis von Bud in Liposomen von 1000 µg zu inhalieren, bis zu 5000 µg könnten in 12 Minuten inhaliert werden (Tabelle 2).

**[0089]** Die Ergebnisse der Inhalation von CsA-DLPC im Modell zur Simulation einer Lunge zeigten, daß bei hochdosiertem CsA-DLPC 4 Minuten erforderlich wären, um 5000 µg zerstäubtes CsA in Liposomen zu inhalieren; 11,5 Minuten wären erforderlich, um 15000 µg CsA zu inhalieren (Tabelle 2). Diese Ergebnisse zeigen die hohe Kapazität der Liposomen für die Verabreichung eines Medikaments als Aerosol.

Tabelle 2

Aerosolanalyse und inhalierte Konzentrationen von zerstäubten hochdosierten Formulierungen von Bud-DLPC- und CsA-DLPC-Liposomen

| <u>Bud 10 mg – DLPC 150 mg</u> | <u>1000 µg Dosis</u> | <u>5000 µg Dosis</u>  |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|
| 2,0 µm MMAD*                   | 3 Minuten            | 12 Minuten            |
| 1,5 GSD                        | Inhalation #         | Inhalation #          |
| <br>                           |                      |                       |
| <u>CsA 20 mg – DLPC 150 mg</u> | <u>5000 µg Dosis</u> | <u>15000 µg Dosis</u> |
| 2,0 µm MMAD*                   | 4 Minuten            | 11,5 Minuten          |
| 1,8 GSD                        | Inhalation #         | Inhalation #          |

\*Andersen-Kaskadenaufprallvorrichtung (Durchschnittswert von 3 Bestimmungen)

#Modell zur Simulation einer menschlichen Lunge (15 BPM/500 ml TV), die Dosierung wurde durch lineare Regressionsanalyse berechnet (Bud-DLPC n = 3; CsA-DLPC n = 2 Analysen)

**[0090]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine hochdosierte Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen, die bis zu etwa 30 mg/ml Cyclosporin A in bis zu etwa 225 mg eines Phospholipids/ml der anfänglichen Vorratskonzentration aufweist. Vorzugsweise weist die Aerosolzusammensetzung aus Liposomen bis zu etwa 21,3 mg/ml Cyclosporin A in bis zu etwa 160 mg eines Phospholipids/ml anfänglicher Vorratskonzentration auf.

**[0091]** Im allgemeinen beträgt in der erfindungsgemäßen Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen die Partikelgröße, die mit dem massegemittelten aerodynamischen Durchmesser gemessen wird, etwa 1,0 µm bis etwa 3,0 µm. Außerdem beträgt in der Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen das Verhältnis zwischen Cyclosporin A und Phospholipid etwa 1 zu etwa 7,5. Das Phospholipid wird vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt, die aus Phosphatidylcholid von Eigelb, Phosphatidylcholid von hydrierten Sojabohnen, Dimyristoylphosphatidylcholid, Dioleoyldipalmitoylphosphatidylcholid und Dipalmitoylphosphatidylcholid besteht.

**[0092]** Im allgemeinen kann die erfindungsgemäße Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen verwendet werden, um eine immunologisch vermittelte Lungenkrankheit zu behandeln. Eine solche immunologisch vermittelte Lungenkrankheit ist vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt, die aus der Abstoßung eines Allotransplantats, Bronchiolitis obliterans, Allergie, Hyperempfindlichkeiten und Asthma besteht.

**[0093]** Ein Individuum mit einer immunologisch vermittelten Lungenkrankheit kann nach einem Verfahren behandelt werden, das einen Schritt aufweist, bei dem dem Individuum eine pharmakologisch akzeptable Dosis einer hochdosierten Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen verabreicht wird. Die Herstellung geeigneter pharmazeutischer Zusammensetzungen und Konzentrationen für die Verabreichung ist für den Fachmann anhand der hier aufgeführten Beschreibung einfach.

**[0094]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine hochdosierte Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen, die bis zu etwa 30 mg/ml Cyclosporin A in bis zu etwa 225 mg Dilauroylphosphatidyl-Cholin/ml anfänglicher Vorratskonzentration aufweist.

#### Patentansprüche

1. Hochdosierte Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen, die folgendes aufweist:  
5 bis 30 mg/ml Cyclosporin A und 37,5 bis 225 mg eines Phospholipids/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration, wobei der massegemittelte aerodynamische Durchmesser eines Partikels des Liposoms, welches das Aerosol umfaßt, 1,0 µm bis 3,0 µm beträgt.
2. Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen nach Anspruch 1, die folgendes aufweist:  
5 bis 21,3 mg/ml Cyclosporin A und 37,5 bis 160 mg eine Phospholipids/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration.
3. Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen nach Anspruch 2, wobei das Phospholipid Dilauroylphosphatidyl-Cholin ist.
4. Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen nach Anspruch 1, wobei das Verhältnis zwischen Cyclosporin A und Phospholipid 1 zu 7,5 beträgt.
5. Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen nach Anspruch 1, wobei das Phospholipid aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Phosphatidyl-Cholin von Eigelb, Phosphatidyl-Cholin von hydrierten Sojabohnen, Dimyristoylphosphatidyl-Cholin, Dilauroylphosphatidyl-Cholin, Dioleolyldipalmitoylphosphatidyl-Cholin und Dipalmitoylphosphatidyl-Cholin.
6. Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Behandlung einer immunologisch vermittelten Lungenkrankheit.
7. Aerosolzusammensetzung aus Cyclosporin A-Liposomen nach Anspruch 6, wobei die immunologisch vermittelte Lungenkrankheit aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einer Alutransplantat-Abstoßung, Bronchiolitis obliterans, Allergie, Hyperempfindlichkeiten und Asthma besteht.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen



## Anhängende Zeichnungen

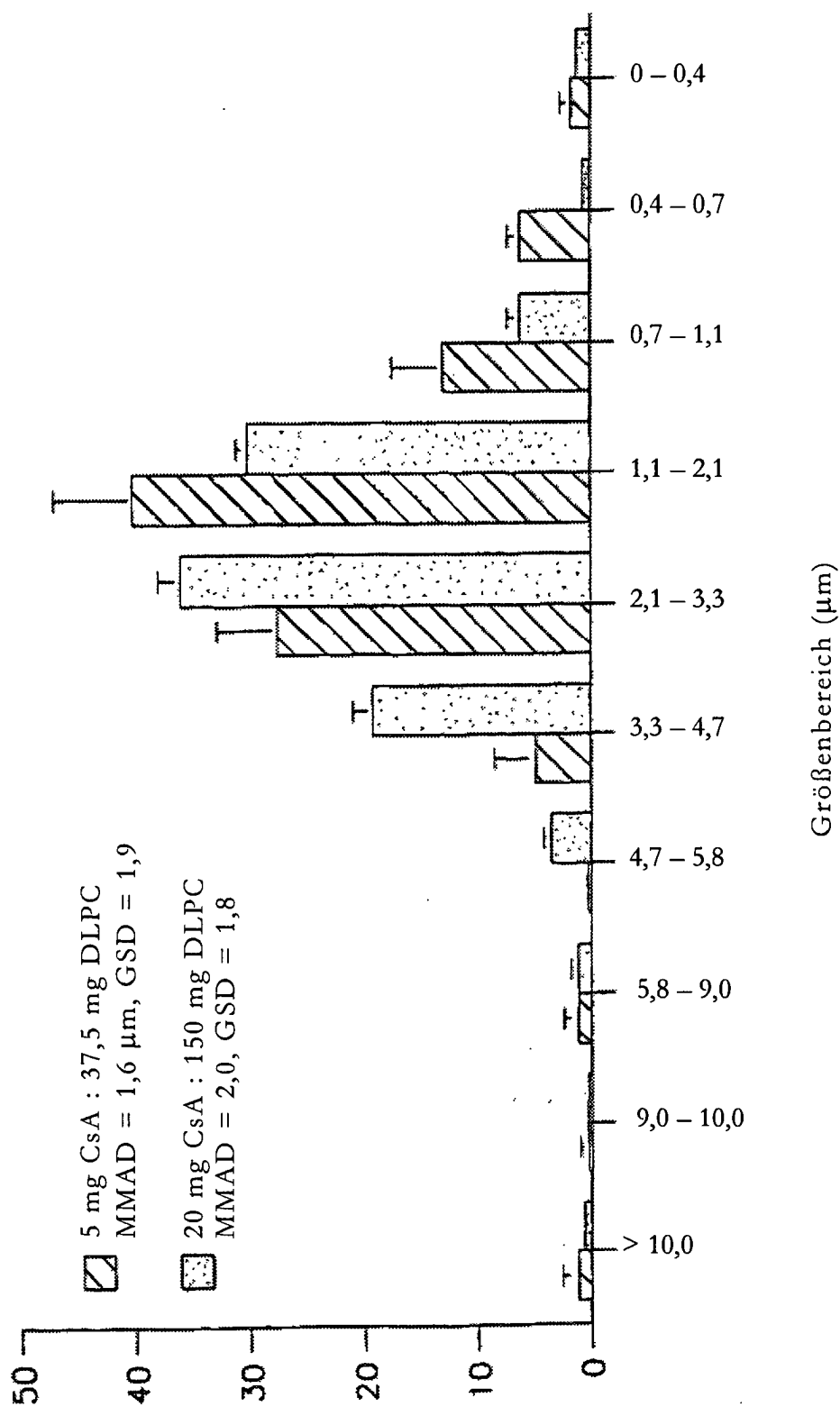


FIG. 1

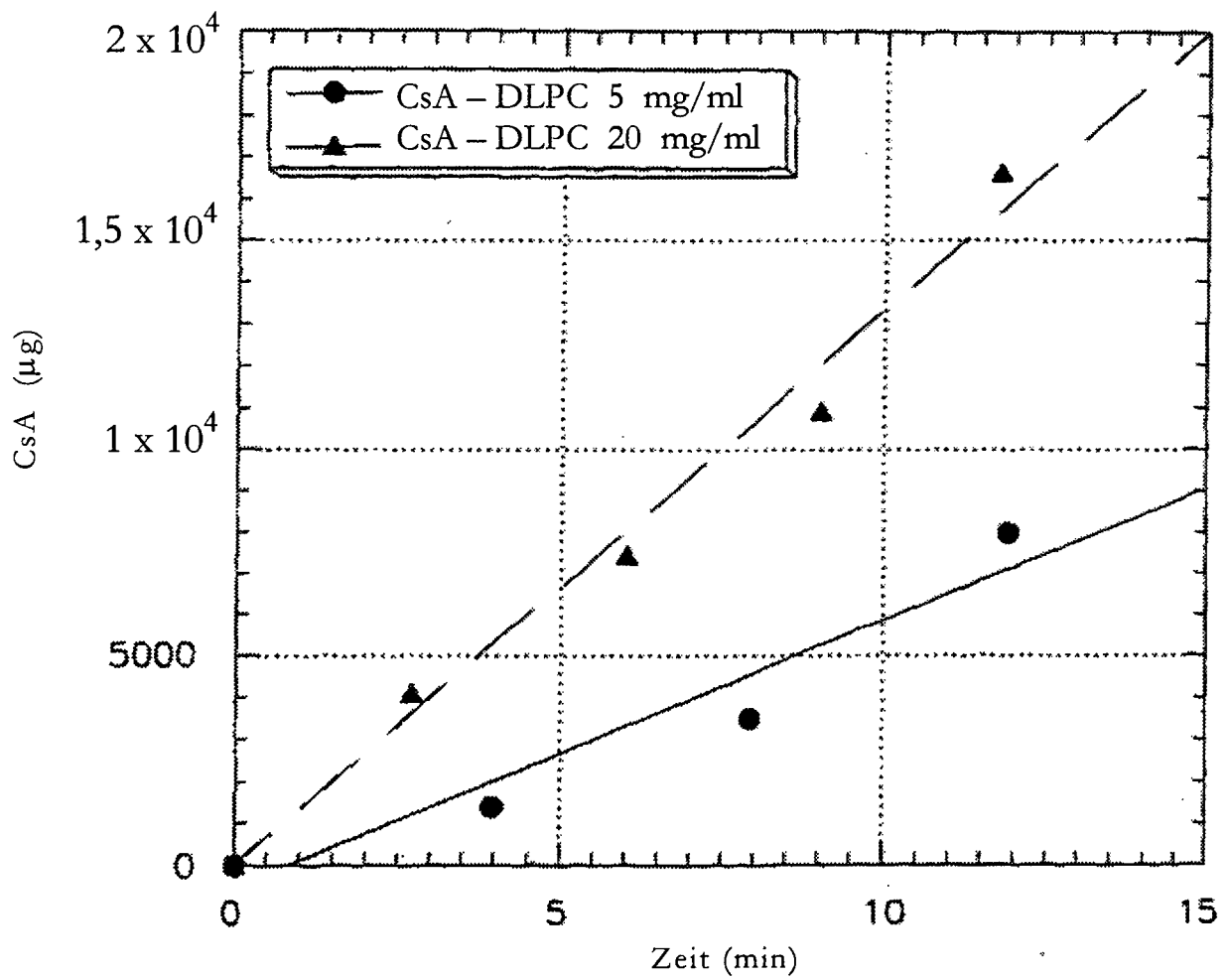


FIG. 2

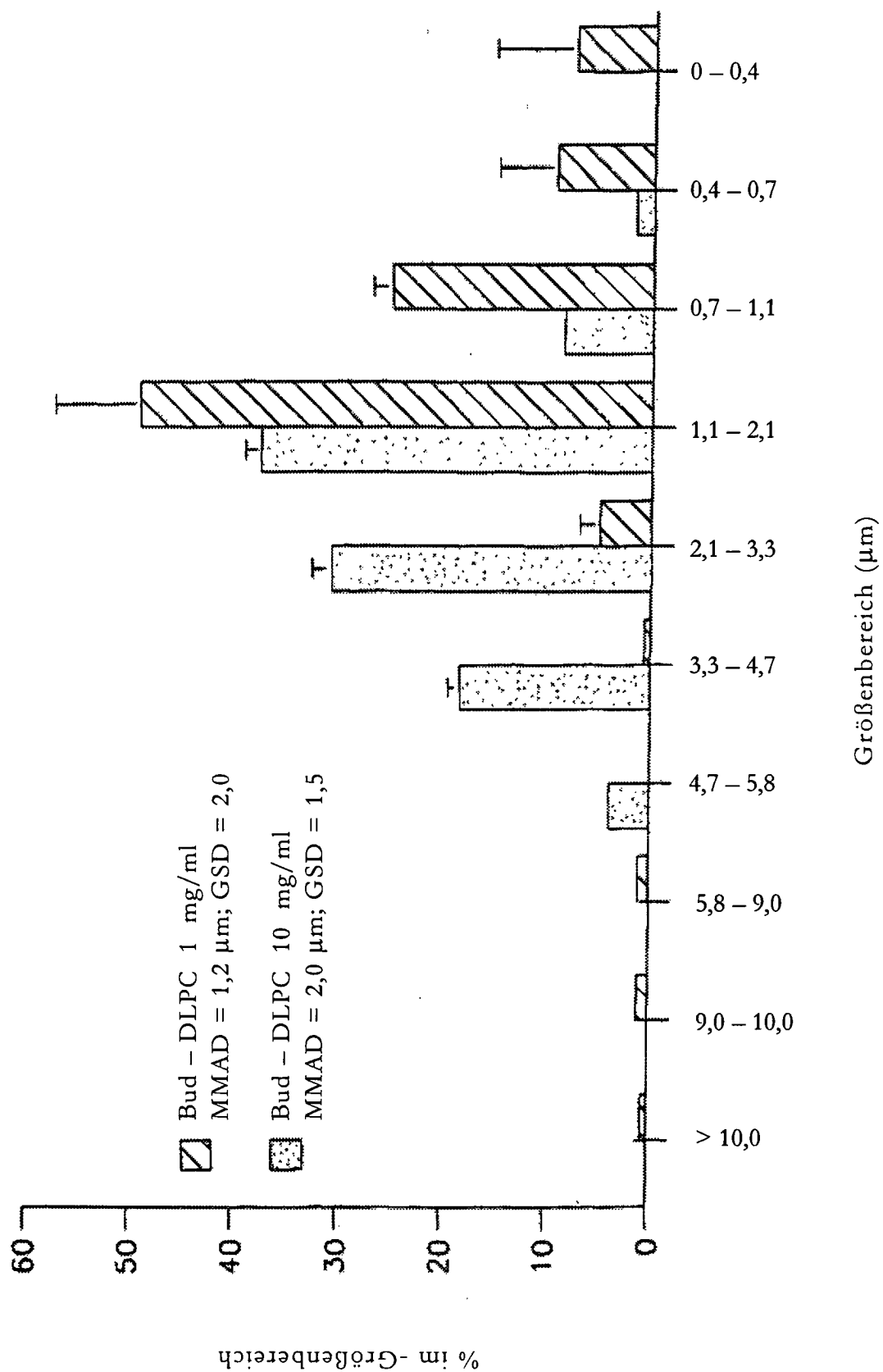


FIG. 3

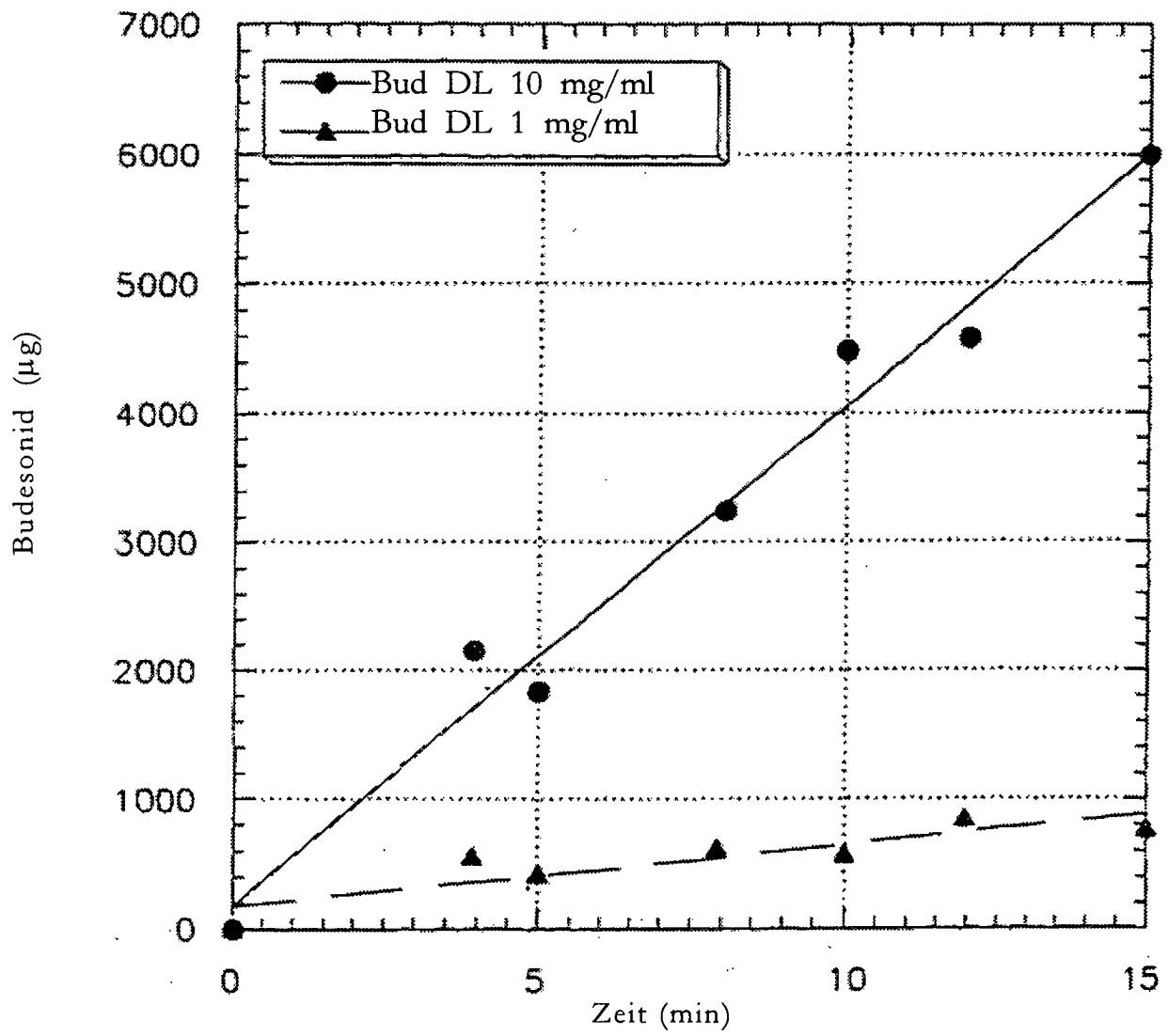


FIG. 4

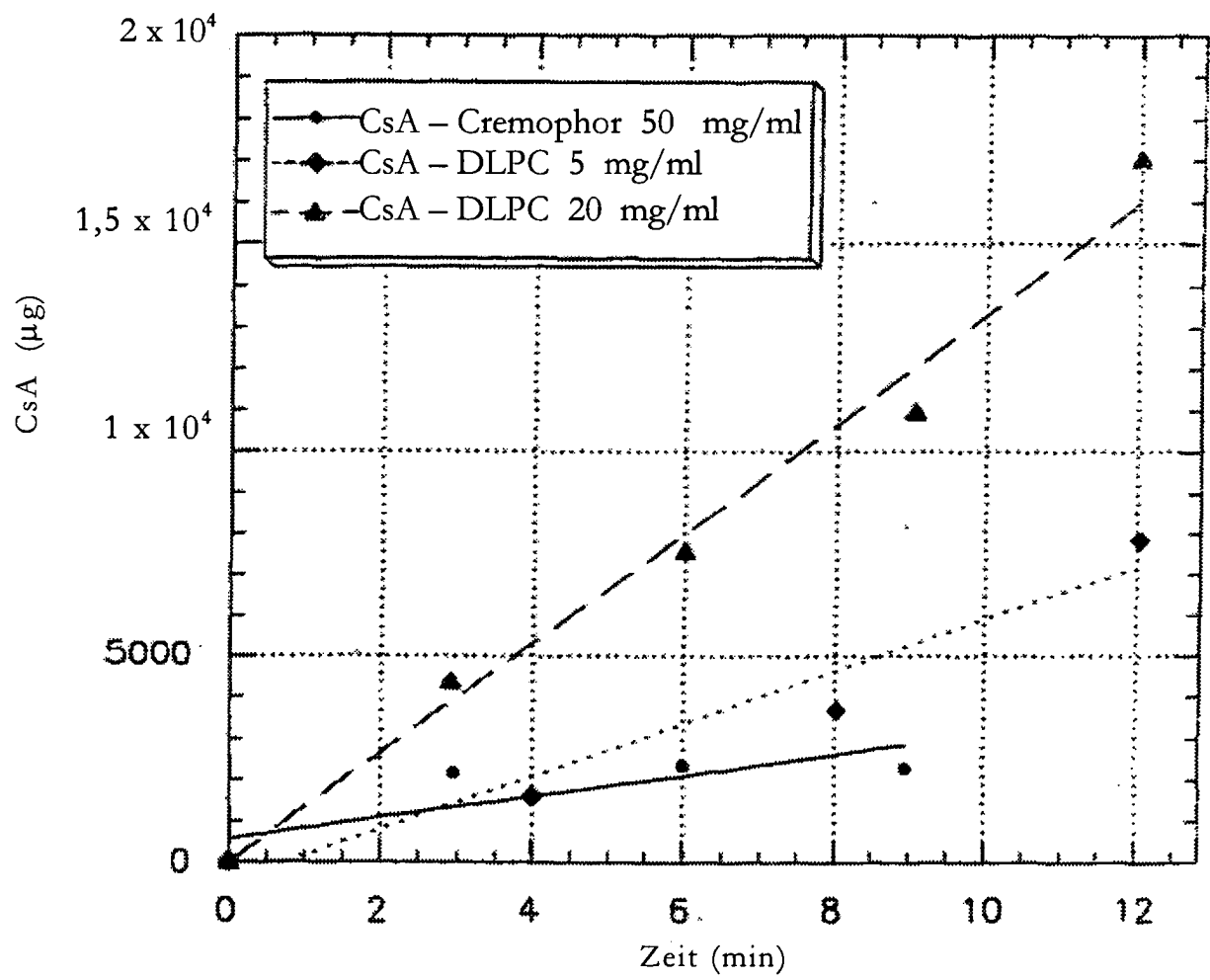


FIG. 5

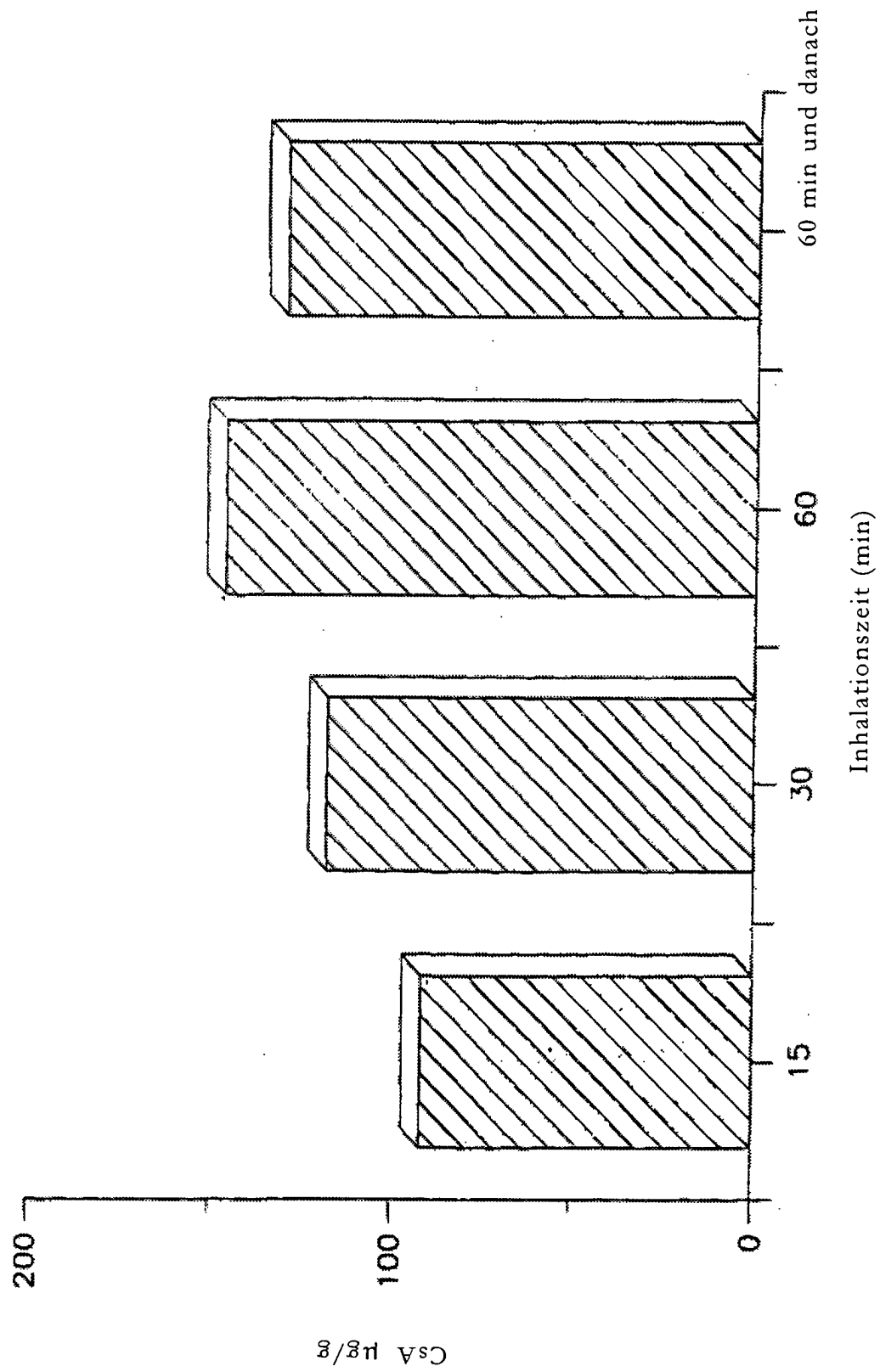


FIG. 6



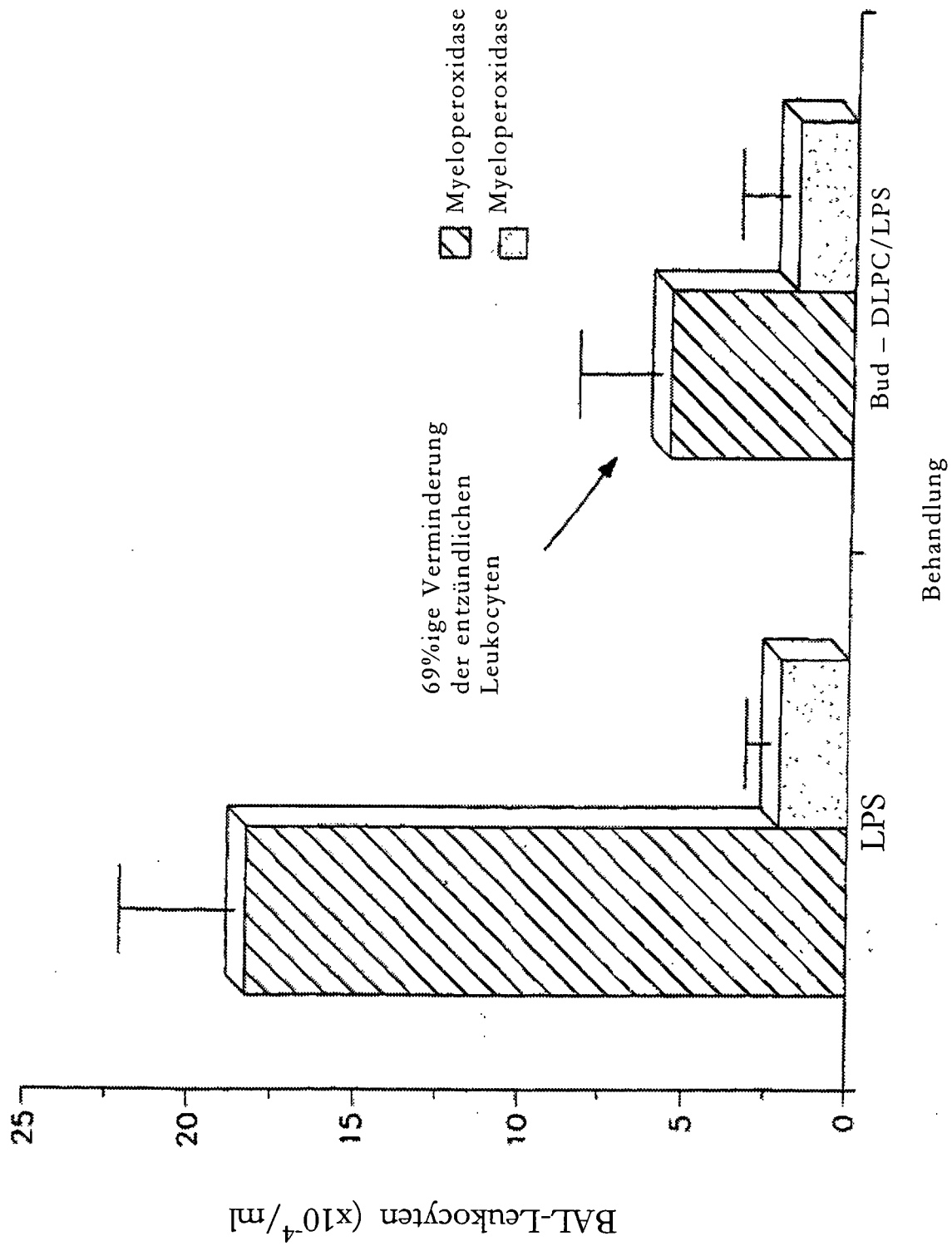


FIG. 7

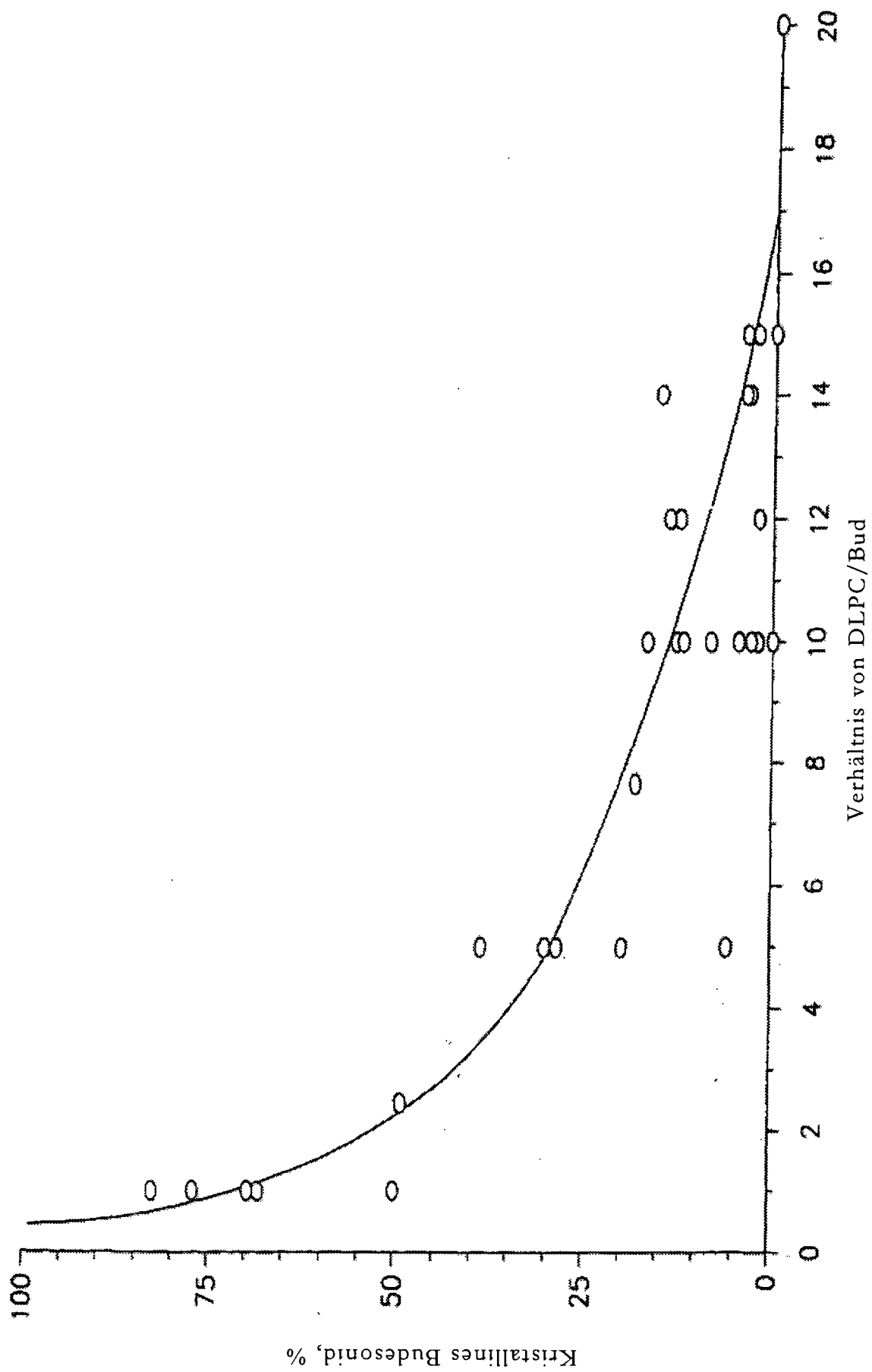


FIG. 8

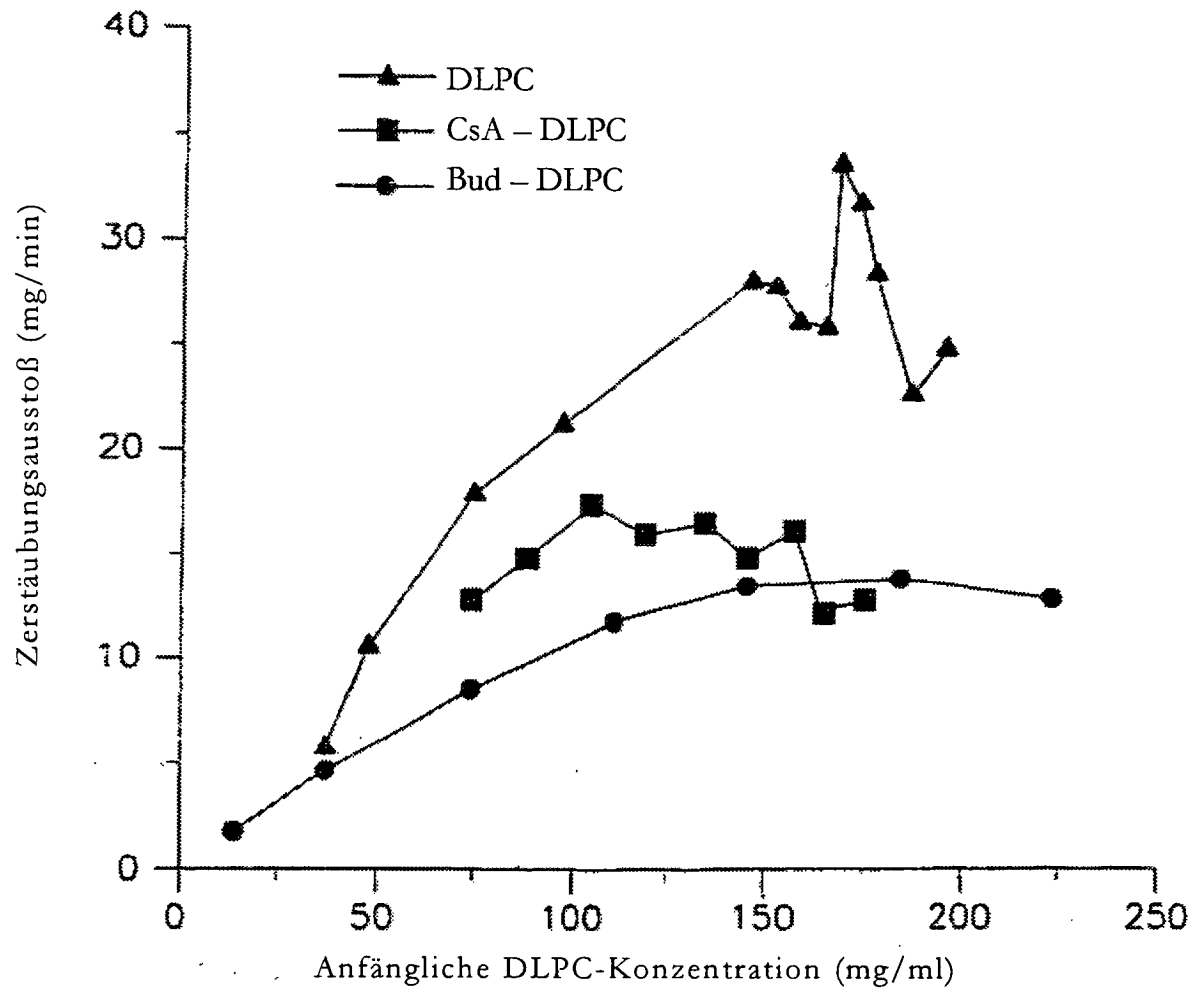


FIG. 9

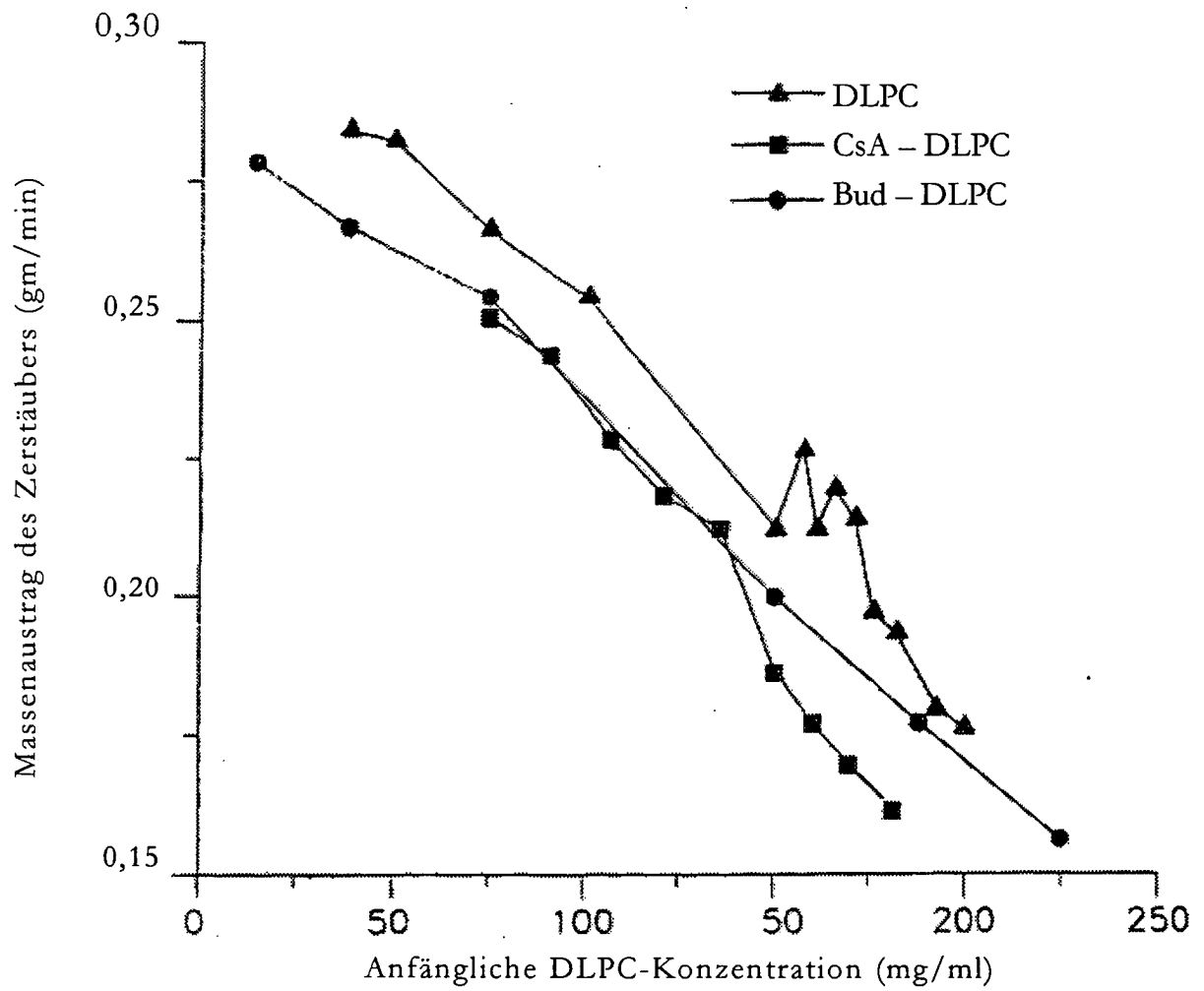


FIG. 10

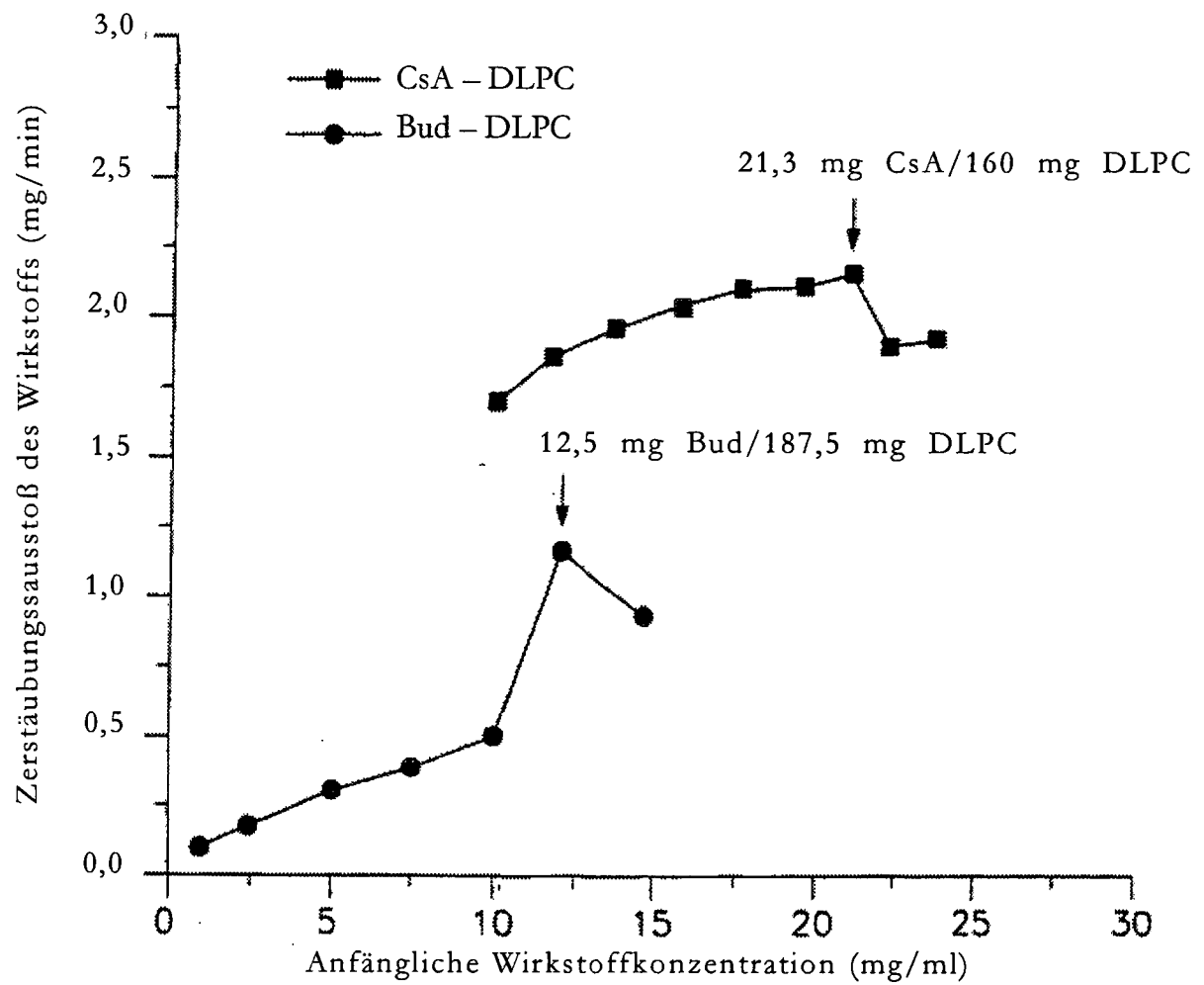


FIG. II

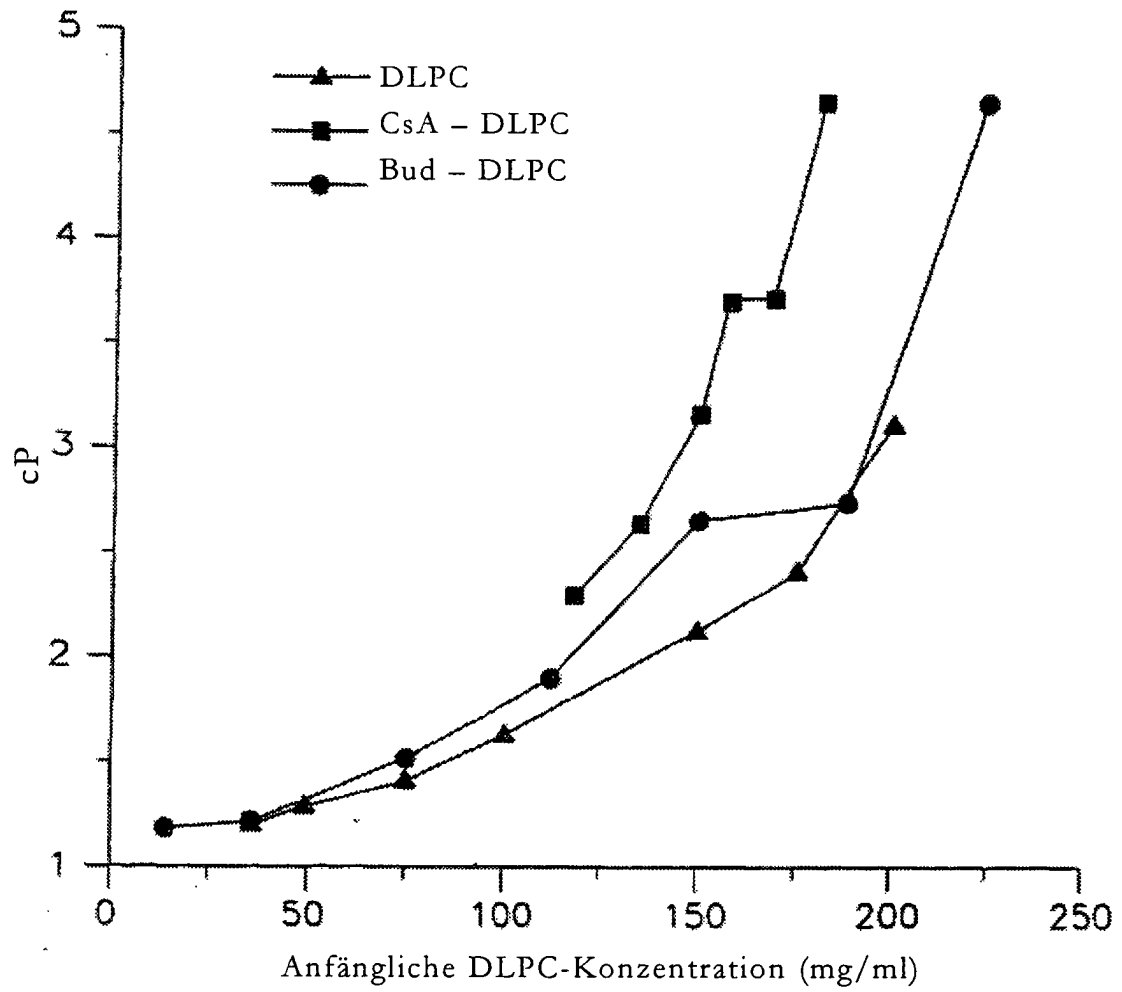


FIG. 12



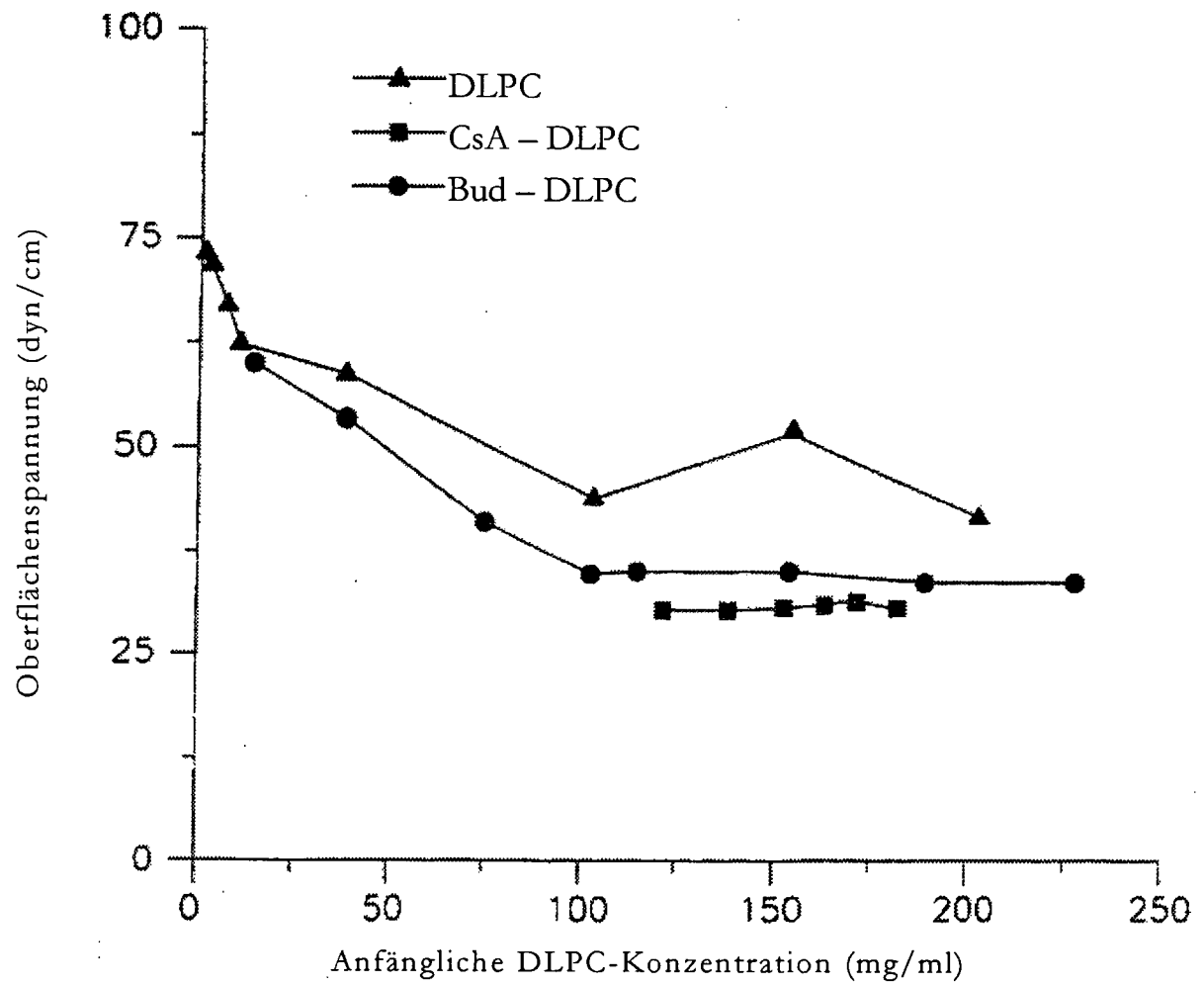


FIG. 13