CH 684308 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 684308 A5

(51) Int. Cl.[5]: A 61 K 31/135
A 61 K 9/127

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 1672/92

(22) Anmeldungsdatum: 25.05.1992

(30) Priorität(en): 30.05.1991 GB 9111611

(24) Patent erteilt: 31.08.1994

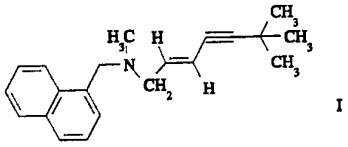
(45) Patentschrift veröffentlicht: 31.08.1994

(73) Inhaber:
Sandoz AG, Basel

(72) Erfinder:
Bodmer, David, Dr., Klingnau
Kissel, Thomas, Dr., Staufen (DE)
Richter, Friedrich, Dr., Schönbühl-Urtenen
Tiemessen, Harry, Dr., Binningen

(54) Liposomen enthaltend ein Allylamin.

(57) Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zubereitungen enthaltende Liposomen, die als Wirkstoff eine Verbindung der Formel I



I

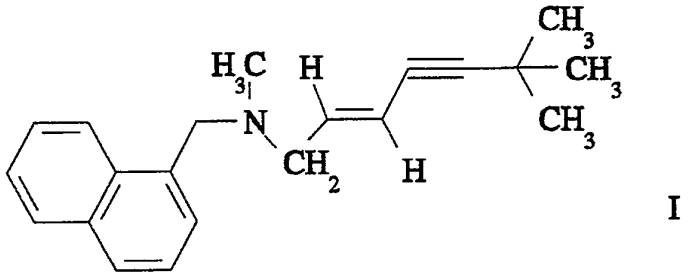
in Form der freien Base oder in Form eines Säureadditionssalzes, enthalten.

Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung solcher pharmazeutischen Zubereitungen durch Verkapselung einer Verbindung der Formel I mit einem geeigneten liposomenbildenden Material.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Allylamin-enthaltende Liposomen, d.h. Liposomen, welche mit einer Allylamin-Verbindung als pharmakologischem Wirkstoff beladen sind.

Gemäss einem Teilaspekt der Erfindung werden eine pharmazeutische Zubereitung bereit gestellt, die eine Verbindung der Formel I



I

als Aktivstoff enthält, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung Liposomen umfasst, die die Verbindung der Formel I enthalten.

Die Verbindung der Formel I kann beispielsweise in freier Form oder in Form eines Säureadditionssalzes verwendet werden. Ein Säureadditionssalz kann beispielsweise aus der freien Base in üblicher Weise hergestellt werden. Umgekehrt erhält man die freie Base aus einem Säureadditionssalz ebenfalls in üblicher Weise. Beispiele für geeignete Säureadditionssalzformen sind das Hydrochlorid, das Lactat und das Ascorbat.

Die Verbindung der Formel I ist beispielsweise aus der BE-PS 853 976 und der EP-A 24 587 bekannt. Sie gehört zur Klasse der Allylamin-Anti-Mykotika. Sie ist unter dem generischen Namen Terbinafin bekannt und im Handel unter dem Handelsnamen LAMISIL erhältlich. Obwohl Terbinafin sowohl bei topischer als auch bei oraler Verabreichung hochaktiv ist, kann seine Antipilzwirkung in vitro durch das Serum zu einem gewissen Grad abgeschwächt werden.

Es ist daher wünschenswert, für diesen Wirkstoff eine Darreichungsform zu finden, welche die Bioverfügbarkeit der Verbindung der Formel I verbessert, um die Serum-Bindung zu überwinden und/oder Parameter wie Pharmakokinetik und Gewebeverteilung günstig zu beeinflussen und/oder Toxizität zu verkleinern. Die Verringerung der Nebeneffekte und Toxizität bei gleichzeitiger Beibehaltung oder Erhöhung der Aktivität und der therapeutischen Wirksamkeit des Wirkstoffes werden angestrebt.

Ein vielversprechender Ansatz, der die obengenannten Kriterien erfüllt wurde jetzt in Form einer pharmazeutischen Zubereitung die Liposomen umfasst, welche die Verbindung der Formel I als Wirkstoff enthalten, gefunden. So wurde eine pharmazeutisch annehmbare, beispielsweise parenterale, Dosisform für die lipophile Verbindung der Formel I gefunden. Dabei werden keine oberflächenaktiven Mittel (Tenside) benötigt. So können zusätzliche Nebeneffekte, die normalerweise mit deren Verwendung verbunden sind, vermieden werden.

Eine pulmonale Applikation von der Zubereitung, welche die Verbindung der Formel I enthalten, beispielsweise mittels eines Inhalators, der eine abgemessene Dosis abgibt (MDI), eines wässrigen oder pulverigen Aerosols, kann abhängig von dem liposomalen Mittel zu einer sofortigen oder verzögerten Freisetzung der Verbindung der Formel I führen und so Antipilzwirkung entfalten. Eine topische Anwendung von Liposomen, welche die Verbindung der Formel I enthalten, kann zu einer verstärkten Akkumulierung des Wirkstoffes am Anwendungsort führen, welche ihrerseits eine verstärkte Wirkung der Verbindung der Formel I im Vergleich zu nicht-liposomalen Anwendungsformen hervorruft. Bei pulmonaler Anwendung sind die Liposomen, welche die Verbindung der Formel I enthalten, gegen Pilzerkrankungen der Lunge wie Candidiasis und die verschiedenen Typen von Aspergillosis wirksam, beispielsweise gegen Infektionen mit Aspergillus fumigatus und verschiedenen nicht-fumigatus Aspergilli.

Eine Anwendung der erfindungsgemässen Liposomen durch Injektion kann im Vergleich zu derselben Menge desselben Wirkstoffes, wenn dieser in einer üblichen Injektionsform angewendet wird, zur verbesserten Wirksamkeit führen. Andererseits kann eine gleiche Wirksamkeit der Verbindung der Formel I mit einer kleineren Menge des Wirkstoffes erzielt werden, wenn die Verbindung der Formel I in Form von Liposomen die den Wirkstoff tragen, angewendet wird. Auf diese Weise kann eine wesentliche Verkleinerung der benötigten Menge der Verbindung der Formel I zur Behandlung einer Pilzkrankheit erreicht werden.

Liposomen sind Lipid-Vesikel, die durch Zugabe einer wässrigen Lösung zu einem trockenen Film von Phospholipiden ausgebildet werden, beispielsweise, wenn nötig, durch Zugabe von Energie oder auch bis zu einem gewissen Grad spontan. Das meistverwendete Lipid ist Phosphatidylcholin. Die Veränderung der Lipidzusammensetzung, Grösse, Ladung und Membranfluidität der Liposomen kann deren Verteilung im Körper stark beeinflussen. Die Wirkstoffmoleküle können entweder in dem wässrigen Hohlraum eingekapselt sein oder in die Doppelschicht eingeschlossen sein. In den letzten zwei Jahr-

zehnten sind Liposomen als Transportvehikel nicht nur für eine Vielzahl von Wirkstoffen sondern auch für genetisches Material, Enzyme oder andere (Macro) Moleküle in lebende Zellen oder andere hydrophobe Barrieren in der Pharmakologie, der Medizin, dem Genetic Engineering sowie der kosmetischen- und Lebensmittelindustrie verwendet worden. Bei der Behandlung von systemischen Pilzerkrankungen sind diese Vesikel auch schon mit Erfolg als Träger von Amphotericin B und Nystatin verwendet worden.

Abkürzungen	
AMB	Amphotericin-B
DMPC	Dimyristoyl-phosphatidyl-cholin
DMPG	Dimyristoyl-phosphatidyl-glycerin
DOPC	Dioleoyl-phosphatidyl-cholin
DOPG	Dioleoyl-phosphatidyl-glycerin
DOPS	Dioleoyl-phosphatidyl-serin
DPPC	Dipalmitoyl-phosphatidyl-cholin
DSPC	Distearoyl-phosphatidyl-cholin
DSPG	Distearoyl-phosphatidyl-glycerin
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HEPES	Hydroxyethyl-piperazino-ethansulfonsäure
HPC	Hydriertes Phosphatidyl-Cholin
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatograpie
IR/ATR	Infrarot-abgeschwächte Total-Reflektion-Spectoskopie
MDI	Inhalator zur Abgabe einer abgemessenen Dosis
MLV	Multilamellares Vesikel
PC	Phosphatidyl-cholin
PE-PEG	Phosphatidylethanolaminpolyethylenglykol
PG	Phophatidyl-glycerin
POPC	Palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-cholin
POPG	Palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-glycerin
PS	Phosphatidyl-serin
TC	Phasen-Übergangstemperatur

Erklärung der Zeichnungen

Zeichnung 1:
Elutionsprofil einer Mischung aus 0,4 mg freier Verbindung der Formel I und aus 1,0 mg erfindungsgemässer Liposomen [vergleiche Beispiel 1, a)].

Zeichnung 2:
Computermodell, welches die Orientierung der Verbindung der Formel I und von POPC in Multi-Doppelschicht-Membranen zeigt (vergleiche Beispiel 1, h)].

Zeichnung 3:
Ablagerung der Verbindung der Formel I in den verschiedenen Teilen des Zwillingsimpaktors nach Zerstäubung von liposomalen Suspensionen.

Zeichnung 4:
Teilchengrösse der Liposomen innerhalb des Zerstäubers.

Die erfindungsgemässen Liposomen können erhalten werden, indem man eine Verbindung der Formel I mit einem geeigneten liposomenbildenden Material einkapselt. Dieses Verfahren stellt einen weiteren Aspekt der Erfindung dar.

Das erfindungsgemässe Herstellungsverfahren kann in üblicher Weise durchgeführt werden, beispielsweise entlang der Leitlinie von Verfahren wie sie beschrieben sind in F. Szoka und D. Papahadjopoulos, «Liposomes und their uses in biology und medicine», Ann. N.Y. Acad. Sci. 308 (1978) 1–462, in R.L. Juliano & D. Layton, «Liposomes as a drug delivery system» in Drug Delivery Systems, Oxford University Press, Inc., New York (1980) p. 189–236, in M. J. Ostro, Liposomes, M. Dekker Inc., New

York (1983) und in G. Lopez-Berenstein and I. J. Fidler, Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer, A. R. Liss, Inc., New York (1989); R. R. C. New, Liposomes – a practical approach, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo (1990).

Weitere Literaturzitate im Zusammenhang mit Liposomen und ihrer Verwendung sind:

I. W. Kellaway und S. J. Fair, Adv. Drug Delivery Reviews 5 [19901 149,

F. Martin, J. Liposome Res. 1 [1990] 407,

K. Egbaria und N. Weiner, Adv. Drug Delivery Reviews 5 (1990) 287,

A. Klibanov et al., FEBS 268 (1990) 235.

Das liposomenbildende Material ist im wesentlichen ein Phospholipid oder eine Mischung von Phospholipiden.

Der Wirkstoff wird vorzugsweise in die Phospholipiddoppelschicht eingeschlossen und ist anschliessend dort lokalisiert.

Eine bevorzugte Variante des Herstellungsverfahrens zur Bildung von Liposomen besteht

a) in der Bildung einer Lösung der Verbindung der Formel I und eines Lipids in einem organischen Lösungsmittel,

b) Entfernung des Lösungsmittels aus der Lösung und Bildung eines Rückstandes,

c) suspendieren des Rückstandes in einer Lösung eines Puffers,

d) schütteln und homogenisieren der Suspension bis Liposomen erhalten werden,

e) Isolierung der Liposomen.

Im Schritt a) schliesst der Begriff «Lösung» auch «Pseudo»-Lösungen wie Emulsionen ein. Es ist jedoch bevorzugt, eine einheitliche, klare Lösung herzustellen. Dabei kann jedes Lösungsmittel verwendet werden, welches die Verbindung der Formel I und das Lipid löst. Das System kann aus einem einzigen Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch bestehen. Es kann beispielsweise bis zu 15% Wasser enthalten. Gewünschtenfalls kann auch ein oberflächenaktives Mittel anwesend sein. Das Lösungsmittelsystem kann jedes geeignete organische Lösungsmittel enthalten, welches vom Lipid durch Verdampfen entfernt werden kann. Es kann auf eine breite Auswahl von Ethern wie Diethylether und Isopropylether, Estern wie Ethylacetat, Alkoholen wie Methanol, Ethanol und tert-Butanol, und halogenierte Kohlenwasserstoffe wie Methylenchlorid und Chloroform verwendet werden. Gewünschtenfalls kann auch Essigsäure anwesend sein. Vorzugsweise werden Methylenchlorid, Methanol oder tert-Butanol verwendet.

Im Schritt b) kann das Lösungsmittel durch übliche Massnahmen entfernt werden. Bevorzugte Massnahmen umfassen das Eindampfen bei vermindertem Druck beispielsweise 10–50 mm Hg, oder Gefriertrocknen im Hochvakuum, beispielsweise unterhalb vom 5 mm Hg, zum Beispiel bei 0,1 mm Hg. Man kann auch die Oberfläche des trocknen Lipids vergrössern, während das Volumen des Lösungsmittels und des wässrigen Puffers (Stufe c) niedrig gehalten wird. Solche Vergrösserung der Lipidoberfläche kann erhalten werden, indem man die Lipide auf ein fein verteiltes Trägermaterial auftrocknet (wie beispielsweise Kristalle von Natriumchlorid, Lactose oder anderen Polysacchariden) oder indem man die Lipide auf Glaskugeln antrocknet (R. R. C. New, Liposomes – a practical approach, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo (1990)). Falls die Gefriertrocknungsmethode verwendet wird, führt man diesen Schritt in geeigneter Weise bei einer Temperatur unterhalb von Raumtemperatur durch. Das Vakuum und die Temperatur werden so kontrolliert, dass die eingedampfte Mischung ungefähr 1–3°C kälter ist als die Umgebung. Die Kontrolle kann in üblicher Weise durchgeführt werden. Ein typisches Gefriertrocknungsprogramm beginnt bei ungefähr –60°C, und erhöht die Temperatur innerhalb von 12 Stunden auf –15°C. Anschliessend wird die Temperatur auf +10°C erhöht und für 2 Stunden beibehalten. Eine alternative Methode um das Lösungsmittel bei einer Produktion von Liposomen im technischen Massstab zu entfernen, ist die Sprühtrockungsmethode wie sie beispielsweise von H. Kikuchi et al., Chem.Pharm.-Bull. 35, 1522 (1991) beschrieben ist. Gemäss diesem Verfahren werden die Lipide und der Wirkstoff in einem flüchtigen organischen Lösungsmittel gelöst, in welchem auch das Trägermaterial suspendiert werden kann, beispielsweise Natriumchlorid oder Saccharose. Die erhaltene Lösung oder Suspension wird dann auf üblichen Wegen sprühgetrocknet, beispielsweise in einem Büchi 190 Mini-Sprühtrockner.

Im Schritt c) ist der vorzugsweise verwendete Puffer ein Phosphatpuffer, beispielsweise von pH 4–8, z.B. von pH 5–6,8. Vorzugsweise ist die wässrige Phase hypotonisch, beispielsweise weniger als 300 mosmol/liter. Die erhaltene Suspension enthält vorzugsweise zwischen ungefähr 0,001 bis ungefähr 0,2 g Lipid pro ml.

Auf der Stufe d) wird vorzugsweise eine mechanische Behandlung eingesetzt, beispielsweise heftiges Rühren oder Verwendung eines Homogenisators, wie eines Superdispax (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) oder eines Microfluidizers (Microfluidics Corp., Newton, Massachusetts, USA). Die Homogenisierung kann auch durch Ultraschall-Beschallung erhalten werden. Geeignete Frequenzen für eine solche Beschallung können beispielsweise von 30 bis 80 kHz betragen. Für eine homogenisierte oder geschüttelte Lösung beträgt die typische Energie zwischen 200 bis 400 Watt für ungefähr 10 ml der Mischung. Zur Vermeidung der Kontamination durch Metall, ist es natürlich bevorzugt, die homogenisierte Mischung vom Titan oder anderen Metallteilen des Ultraschallgenerators getrennt zu halten. Die Temperatur beträgt vorzugsweise von ungefähr 10°C bis ungefähr 70°C. Für ungesättigte Lipide ist Raum-

temperatur bevorzugt, für gesättigte Lipide 60°–70°C. Gewünschtenfalls kann auf die Ultraschallbehandlung ein Rührvorgang mit einem mechanischen Hochgeschwindigkeitsrührer bei beispielsweise 10 000 bis 27 000 Upm erfolgen.

Auf der Stufe e), können die Liposomen durch übliche Techniken isoliert werden, beispielsweise durch Ultrafiltration, Zentrifugieren, Ionenaustausch oder Gelchromatographie, Dialyse, usw. Die Isolation der Vesikel ist nicht nötig, wenn der Wirkstoff zu einem hohen Grad in die Phospholipiddoppelschicht eingebaut wird. Dies trifft beispielsweise zu für Konzentrationen der Verbindung der Formel I von weniger als 1 mg/ml. Die Liposomen können durch ein Filter mit geeigneten kleinen Öffnungen, beispielsweise 0,1 bis 1 Micron filtriert und sterilisiert werden. Gewünschtenfalls kann die Filtration auch oberhalb des Phasenübergangspunktes des Lipids, beispielsweise zwischen 30°C und 70°C durchgeführt werden. Um die Langzeitstabilität der Zubereitungen zu verbessern, werden diese gefriergetrocknet.

Eine weitere bevorzugte Einschrittmethode zur Herstellung der liposomalen Zubereitung bei der Herstellung von Liposomen, welche die Verbindung der Formel I enthalten, ist von M. Brandl et al. in Drug Development and Industrial Pharmacy 16 (1990) 2167, beschrieben worden. Gemäss diesem Verfahren werden die Phospholipide und die Wirksubstanz direkt in der wässrigen Phase dispergiert und anschliessend homogenisiert, beispielsweise in einem geeigneten Homogenisierapparat wie er beispielsweise unter dem Handelsnamen Microfluidizer erhältlich ist.

Die gebildeten Vesikel können unilamellar oder multilamellar sein. Ihre Grösse kann zwischen ungefähr 20 nm bis ungefähr 10 µm als mittlerer Durchmesser variieren. Vorzugsweise besitzen sie einen Durchmesser von weniger als ungefähr 200 nm. Die Verbindung der Formel I ist vorzugsweise Teil der Phospholipidlamellen. Nur kleinere Mengen sind Teil der intraliposomalen Flüssigkeit oder sind in beiden Bestandteilen anwesend. Die Inkorporation in die Phospholipid-Doppelschicht kann bis zu einer Konzentration von wenigstens 1 mg/ml erfolgen. Die Liposomen enthalten ein oder mehrere Lipide, vorzugsweise Phospholipide, beispielsweise Phosphomonoglycerid, Phosphatidylsäure und Sphinolipid, vorzugsweise Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin, Stearylamin oder Phosphatidylsäure; insbesondere Dimyristoylphosphatidylcholin, Dimyristoylphosphatidylglycerin, Distearoylphosphatidylcholin, Distearoylphosphatidylglycerin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerin und Phosphatidylserin. Die Liposomen können auch ein Sterol wie Cholesterin enthalten.

Weiter kann Phosphatidylethanolaminpolyethylenglykol (PE-PEG) in die Liposomen eingearbeitet werden und es kann die Plasmahalbwertzeit der Liposomen nach i.v.-Anwendung verlängern, woraus eine verzögerte Freisetzung der Verbindung der Formel I oder eine gezielte Abgabe der Verbindung der Formel I aus den Liposomen resultiert. Zum Zwecke der Injektion sind hydrierte Phospholipide, welche einen Schmelzpunkt über 42°C haben bevorzugt, beispielsweise DSPC, DSPG oder HPC.

Die Gesamtkonzentration der Phospholipide beträgt von ungefähr 1 mg/ml bis ungefähr 200 mg/ml und liegt vorzugsweise zwischen 15 mg/ml und 100 mg/ml. Die Konzentration der Verbindung der Formel I ist beispielsweise zwischen ungefähr 0,1 mg/ml bis ungefähr 20 mg/ml, vorzugsweise liegt sie zwischen ungefähr 0,3 mg/ml bis ungefähr 10 mg/ml, insbesondere bei 5 mg/ml. Das Gewichtsverhältnis der Verbindung der Formel I zu der Gesamtmenge der Phospholipide ist beispielsweise zwischen ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:2000, vorzugsweise ungefähr 1:10. Die Liposomen können in üblicher Weise isoliert und sterilisiert werden.

Weiter können synthetische Phospholipide mit Vorteil verwendet werden. Solche synthetischen Phospholipide wie Phosphatidylethanolaminpolyethylenglykol (PE-PEG) führen zu einer Verlängerung der Plasmahalbwertzeit, insbesondere dann wenn sie in neutrale und kleine Liposomen eingeführt werden.

Einige Liposomen, die aus neutralen, d.h. ungeladenen Phospolipiden bestehen, können eine gewisse Instabilität zeigen, wie etwa Aggregation und Sedimentation nach einer Lagerung für mehrere Tage. Dieses kann verhindert werden, indem man die Liposomen lyophilisiert und sie kurz vor Gebrauch resuspendiert. Um homogene Produkte zu erhalten, ist es angezeigt, die Liposomen innerhalb von 30 Minuten schnell auf eine Temperatur unterhalb der eutektischen Temperatur, z.B. auf –28°C, vorzugsweise auf –40°C abzukühlen, wenn Laktose als Gefrierschutzmittel verwendet wird. Geeignete Gefrierschutzmittel sind beispielsweise Sucrose, Trehalose, Lactose, Mannitol, Maltose, Fructose, Glucose, Galactose, Mannose, Xylit und Sorbit, vorzugsweise aber Lactose, Maltose, Sucrose und Trehalose, insbesondere Lactose und Maltose. Besonders bevorzugt ist 9%ige Lactose. Während der Lyophilisierung kann eine Abnahme des Durchmessers von ungefähr 10% bis 40% eintreten. Im allgemeinen wird keine wesentliche Änderung der Grösse und des Inhalts nach der Lyophilisierung innerhalb der ersten zwei Wochen bei einer Aufbewahrungstemperatur von 5°C auftreten. Nach einem Monat kann eine Verkleinerung der Vesikelgrösse um 15% bei einigen Liposomen beobachtet werden. Die Konzentration des Gefrierschutzmittels ist unkritisch und liegt im Bereich von ungefähr 2% bis ungefähr 10%. Die Aufbewahrung erfolgt vorzugsweise bei ungefähr 5°C.

Nach der Rekonstitution der Liposomen ist die Osmolarität gut geeignet für beispielsweise parenterale Anwendung und liegt typischerweise zwischen ungefähr 205 bis ungefähr 500, z.B. zwischen 290 und 350 mosmol/l.

Die Rekonstitution wird dadurch herbeigeführt, dass man Wasser zufügt, bis das ursprüngliche Volumen erhalten ist. Vorzugsweise wird dies kurz vor der Anwendung bewerkstelligt. Zur analytischen Be-

stimmung der Verbindung der Formel I und der Phospholipide, wird eine in Wasser rekonstituierte Probe, vorzugsweise im Verhältnis 1:1, mit einem Alkohol wie 50%igem Methanol verdünnt.

Die Sterilisation wird erreicht, indem man die Liposomen vor der aseptischen Abfüllung und Gefriertrocknung steril-filtriert (0,2 µm Porengrösse). Bei der Herstellung in grossem Massstab ist es bevorzugt, während der Behandlung in einer wässrigen Phase eine 1%ige Benzylalkohol-Lösung als Konservierungsmittel zuzusetzen. Benzylalkohol kann während des abschliessenden Gefriertrocknungsschrittes wieder vollständig entfernt werden.

Überraschenderweise wird eine Verbindung der Formel I für gewöhnlich protoniert wenn sie in die Lipidmembran eingearbeitet ist, auch dann, wenn die Liposomen ausgehend von der freien Base hergestellt worden sind.

Die folgenden Beispiele illustrieren die Erfindung (die Verbindung der Formel I ist hiernach kurz Verbindung 1 genannt);

Beispiel 1: Herstellung von Liposomen

(Verbindung 1; Labormasstab)

10 mg der Verbindung 1 in Form der freien Base werden in Methanol gelöst und mit methanolischen Lösungen von Soyabohnen-Phosphatidylcholin (PC) und -Dimyristoyl-phosphatidyl-glycerin (DMPG) in einem molaren Verhältnis von 1:4:2, d.h. in einem Gewichtsverhältnis von 1:7:3 gemischt. Die Mischung wird in einem Rundkolben im Vakuum unter zu Hilfenahme eines Rotationsverdampfers getrocknet, wobei sich ein Film aus dem Lipid und der Verbindung 1 bildet. Der getrocknete Film wird durch Schütteln mit 10 ml eines 20 mM Phosphatpuffers pH 6,8, welcher 9% des Gefrierschutzmittels Lactose enthält, hydratisiert. Die sich bildenden Liposomen sind multilamellare Vesikel (MLV's) von uneinheitlicher Grösse bis zu ungefähr 50 Micron. Die MLV-Suspension wird durch heftiges Rühren homogenisiert und durch zweifache aufeinanderfolgende Extrudierungen durch Polycarbonatmembranen mit einer Porengrösse von 1, 0,4 und 0,2 Micron auf eine einheitliche Grösse gebracht. Anschliessend wird die liposomale Zubereitung lyophylisiert und die isolierten Liposomen werden bei 5°C aufbewahrt.

In Varianten des Beispiels 1 werden Maltose, Sucrose oder Trehalose als Gefrierschutzmittel verwendet.

In einer weiteren Variante wird die Homogenisierung der MLV durch Ultraschallbehandlung erzielt.

In einer weiteren Variante wird die Homogenisierung der MLV durch Behandlung mit einem Superdispax-Homogenisator (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) erzielt.

In einer weiteren Variante wird die Homogenisierung der MLV durch Behandlung mit einem Microfluidizer-Homogenisator (Microfluidics Corp., Newton, Massachusetts, USA) erzielt.

In weiteren Varianten werden die Soyabohnen-PC und -DMPG durch die folgenden Phospholipide ersetzt:

- Dimyristoyl-PC (DMPC);
- Dipalmitoyl-PC (DPPC);
- Dioleoyl-PC (DOPC);
- Dioleoyl-PG (DOPG);
- Palmitoyl-oleyl-PC (POPC);
- Palmitoyl-oleoyl-PG (POPG);
- Dioleoyl-phosphatidyl-serin (DOPS);
- Phosphatidyl-serin (PS) aus Rinderhirn; und
- Phosphatidylethanolaminpolyethylenglykol (PE-PEG).

In einer weiteren Variante wird die Verbindung der Formel I in Form des Hydrochloridsalzes verwendet.

Tabelle 1
Beispiele von Liposomen der Verbindung 1:

Ansatz Nr. Grösse*	Verbindung 1 [mg/ml]	Phospholipide Mischverhältnis Konzentration		Mischungsverhältnis (molar) [Verbindung 1/Phospholipide]	Vesikel (nm)
		[w/w]	[mg/ml]		
1	1 (Base)	PC/DMPG 7/3	15	1/6	215
2	1 (HCl-Salz)	PC/DMPG 7/3	15	1/6	223
3	0,3–3,0 (Base)	PC/DMPG 7/3	15	1/2–1/20	
4	1 (Base)	POPC/DOPS 7/3	15	1/6	240
5	3 (Base)	POPC/DOPS 7/3	30	1/4	171
6	3 (Base)	POPC/DOPS 7/3	30	1/4	250
7	3 (Base)	POPC/DOPS 7/3	30	1/4	250

w/w = Gewicht/Gewicht
* als hydrodynamischer Parameter

Charakterisierung:

a) Maximale Verkapselungskapazität

Die liposomalen Zubereitungen (vor lyophylisierung) sind Suspensionen kleiner Vesikel (Grösse zwischen 100–250 nm im Durchmesser) von milchiger Erscheinungsform, die im flüssigen Zustand für mehrere Tage stabil sind. Um festzustellen, welcher Menge der Verbindung der Formel I in den Vesikeln verkapselt worden ist, werden Proben der GPC unterworfen, wobei entweder 10 ml Sephadex G25 eingefüllt in Glassäulen oder gebrauchsfertige pd10 Säulen (Pharmacia) mit 9.1 ml Sephadex G25 verwendet werden. Alle Säulen werden vor dem Gebrauch mit der dreifachen Menge an Elutionsmittel des Leervolumens der Säule gewaschen.

Die Proben (1 ml) werden auf die Säulen aufgebracht und die liposomale Fraktion wird mit 0.15 M Natriumchlorid (0.9%) in Wasser eluiert. Nachdem 10 bis 15 ml Elutionsmittel abgelaufen sind, wird das Elutionsmittel durch 10 mM Acetatpuffer pH 3 ersetzt, um die Verbindung der Formel I, welche nicht in den Vesikeln verkapselt worden ist (freie Verbindung 1), zu eluieren. Die Fraktionen werden auf die Verbindung 1 mittels HPLC Analysen untersucht [siehe i)].

Bei Phospholipidkonzentrationen von 15 mg/ml kann die Verbindung 1 bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Phosphatpuffer pH 6,8 vollständig in den Vesikeln verkapselt werden. Dies kann entweder festgestellt werden indem man durch Mikroskopie die Kristalle der Verbindung 1 sichtbar macht, welche gebildet werden wenn die Wirksubstanz im Überschuss zugesetzt ist, oder durch Abtrennung der nichtverkapselten Verbindung I von der liposomalen Verbindung I durch GPC unter Verwendung von Sephadex G25. Die Zeichnung 1 zeigt das Elutionsprofil einer Mischung von 0,4 mg freier Verbindung 1 und 1,0 mg Verbindung-1-Liposomen. Die auf die Säule aufgebrachte Verbindung der Formel I wird zu 100% zurückgewonnen. Die liposomale Fraktion wird mit 0,9% Natriumchlorid (12 ml) eluiert, die freie Verbindung 1 wird mit 10 mM Acetatpuffer ph 3,0 eluiert. Die durchgehende Linie zeigt die Menge der Verbindung 1 in den Einzelfraktionen; die unterbrochene Linie zeigt die kumulative Menge der eluierten Verbindung 1.

Die Verkapselungskapazität wird von der Zusammensetzung des Puffers, welcher für die Hydratisierung verwendet wird, beeinflusst: mit einem Phosphatpuffer und HEPES-Puffer können nur 1 mg/ml verkapselt werden. Es kann beobachtet werden, dass die Verbindung der Formel I zu einem gewissen Grade von diesen beiden Puffern ausgefällt wird. Wenn man demineralisiertes Wasser für die Einarbeitung benutzt, können Konzentrationen bis zu 2,5 mg/ml erreicht werden (Tabelle 2): Verbindung-1-Liposomen werden wie oben beschrieben unter Verwendung von Soyabohnen-Phosphatidyl-cholin und Dimyristoyl-phosphatidyl-glycerin (DMPG) in Gesamtkonzentrationen von 15 mg/ml wie oben beschrieben hergestellt (Verhältnis 7:3). Analytische Proben werden auf eine Gelpermeationschromatograpie-(GPC)-Säule aufgebracht und auf die liposomal verkapselte Verbindung 1 und freie Verbindung 1 untersucht:

Tabelle 2
Aufnahmekapazität von Liposomen für Verbindung 1 mit verschiedenen Puffern

Konzentration (mg/ml)	Molares Verhältnis [1]		Kristallbildung [2] beobachtet	GPC-Fraktionen (%)		Vesikelgrösse [3]		Verlust [4] (%)
theoret.	gefunden	theoret.		frei	liposomal	d(nm)	pD	gefunden
Phosphat Puffer (20 mH, pH 6,8):								
1	0,93	1:6,5	–	0	>91	141	2	5
1,5	1,39	1:4,3	+	<1	>76	149	4	14
2	1,30	1:3,3	+	0	>80	143	2	26
2,5	1,25	1:2,6	+	0	78	196	6	35
3	1,23	1:2,2	+	<1	83	139	2	32
HEPES Puffer (35 mM, pH 6,8):								
1	0,90	1:6,5	–	0	86	131	3	4
1,5	1,53	1:4,3	(+)	<1	>80	147	3	6
2	1,50	1:3,3	+	14	52	166	4	17
2,5	1,43	1:2,6	+	<1	54	161	2	25
3	2,23	1:2,2	+	>1	>67	147	2	17
Wasser:								
1	0,99	1:6,5	–	0	82	99	2	5
1,5	1,58	1:4,3	–	0	91	121	2	5
2	1,99	1:3,3	–	0	90	131	2	4
2,5	1,47	1:2,6	–	<1	86	124	3	11
3	2,46	1:2,2	(+)	<1	83	126	3	10

1) molares Verhältnis von Verbindung 1 zu Phospholipiden
2) Mikroskopbeobachtung (Axioskop, Zeiss)
3) Vesikelgrösse: d = Durchmesser, pD = Polydispersität (1 = monodispers, 10 = polydispers)
4) Verlust = Rückstände an Kolben und Filter nach Herstellung

Liposomale Zubereitungen mit höheren Konzentrationen an Verbindung 1, d.h. 2 und 4 mg/ml, und einer Anzahl von verschiedenen Phospholipiden (Tabelle 3) bestätigen die ungefähre Grenze von 1 mg Verbindung 1 /ml bei Phospholipid Konzentrationen von 15 mg/ml, d.h. einem ungefähren molaren Verhältnis zwischen Wirkstoff und Lipid von 1:6. Die Verkapselung ist unabhängig von den verschiedenen eingesetzten Phospholipiden:

Tabelle 3
Verkapselung der Verbindung 1 bei Konzentration von 2 und 4 mg/ml mit verschiedenen Phospholipiden

Phospholipide	Verbindung 1 Konzentration (mg/ml) gefunden	
	2 mg/ml-theoret.	4 mg/ml – theoret.
PC	1,0 ± 0,5	1,2 ± 0,7
PC/DOPG	1,8 ± 0,1	2,2 ± 1,0
PC/DOPS	1,6 ± 0,2	3,0 ± 0,6
HPC	2,0 ± 0,2	3,5 ± 0,4
HPC/DOPG	1,7 ± 0,3	2,2 ± 0,2
HPC/DOPS	2,0 ± 0,3	3,2 ± 0,6
POPC	1,8 ± 0,2	3,4 ± 0,4
POPC/DOPG	1,9 ± 0,1	2,5 ± 0,3
POPC/DOPS	1,4 ± 0,2	2,8 ± 0,4
DOPC/DOPG	1,6 ± 0,3	3,4 ± 0,4
DMPC	1,8 ± 0,4	1,5 ± 1,0
DMPC/DMPG	2,0 ± 0,3	3,0 ± 1,2

Für die Hydratisierung wurde Phosphatpuffer (20 mM, pH 6,8) verwendet. Die Phospholipid Konzentration betrug 15 mg/ml. Der Gehalt an Verbindung 1 wurde nach Filtration durch 0,2 µm Membranen bestimmt. Von jeder Konzentration wurden drei Zubereitungen untersucht (Mittelwert ± SD, n = 3).

b) Wirkungsgrad der Verkapselung

Bei Konzentrationen der Verbindung 1 (in Form der freien Base) bis zu 1 mg/ml beträgt der Aufnahmewirkungsgrad mehr als 90%. Bei höheren Konzentrationen wird der Wirkungsgrad durch das Ausfallen des Überschusses an Verbindung 1 (wird nicht verkapselt) reduziert.

c) Ausbeuten

Die Ausbeuten liegen im Bereich von 70–80% bei Ansatzgrössen bis zu 10 ml (10 mg Verbindung 1). Bei 100 ml (100 mg Verbindung 1) betragen die Ausbeuten 90% und bei 1 l (1 g Verbindung 1) mehr als 90%.

d) Verunreinigungen und Stabilität

Zwei Formen von lyophilisierten Liposomen der Verbindung 1 (Zusammensetzung: siehe Ansätze 1 und 2, Tabelle 1) wurden einem Stabilitätstest bei verschiedenen Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten unterzogen: –25°C, 5°C, 25°C und 30°C bei 75% relativer Luftfeuchtigkeit. Sterilität wurde durch Filtration durch 0,2 µm Membranen und aseptische Abfüllung auf einer sterilen Abfüllanlage erreicht. Die Resultate sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Nach der Herstellung wurde fast kein Abbau der Verbindung 1 gefunden. Nach einem Monat betrug der Grad der Verunreinigung weniger als 2%, auch bei Temperaturen von 30°C.

Die Daten über die Dreimonatsstabilität zeigen, dass nach einem Monat eine leichte Zunahme von Abbauprodukten auftritt, insbesondere bei erhöhter Temperatur. Der Grad der Verunreinigung nach drei Monaten bei einer Aufbewahrung von 5°C lagen unter 1%. Eine Lagerung bei 5°C ist daher angebracht.

Tabelle 4
Stabilität von Liposomen der Verbindung 1

Lagerbedingungen	Beladung mit Verbindung 1 (%)		Abbauprodukt von Verbindung 1 (%)	
	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1
Bei Beginn –25°C	100	100	0,2	0,1
1 Monat	95,7	94,9	0,3	0,3
3 Monate	95,6	96,8	0,4	0,5
5°C 1 Monat	96,1	95,1	0,9	0,7
3 Monate	95,6	96,1	0,9	1,0
25°C 1 Monat	95,7	94,5	1,4	1,5
3 Monate	95,2	95,1	2,7	2,9
30°C/75% r.h. 1 Monat	95,2	94,7	1,5	1,9
3 Monate	95,7	94,5	3,1	3,9

r.h. = relative Luftfeuchtigkeit

Lösungmittelrückstände:

Die Zubereitung und Lypophilisierung der Verbindung-1-Liposomen führte zu Methanolgehalten unter 0,1%. Chloroform war nicht auffindbar (Grenzwert = 0,05%).

f) Vesikelgrösse

Die Vesikelgrösse der Liposomen wird normalerweise durch Laserlichtstreuung bestimmt und als mittlerer hydrodynamischer Durchmesser ausgedrückt, solange die Teilchengrössen-Verteilung annähernd eingipfelig ist. Nach der Herstellung und Filtration durch 0,2 µm Membranen betragen die mittleren Durchmesser der Verbindung-1-Liposomen ungefähr (200–300 nm). Nach Gefriertrocknung und Redispersion in Wasser ist die Vesikelgrösse kleiner (150–250 nm). Während der Lagerung werden die Vesikel wiederum kleiner: eine 10%ige Abnahme wird nach drei Monaten beobachtet (Tabelle 5):

Tabelle 5
Teilchengrösse der Verbindung-1-Liposomen nach Lyophilisierung, Lagerung und Rekonsitution

	Ansatz	Hydr. Radius		Hydr. Durchmesser	Verteilung [Ø (nm)]	
		Rh (nm)	PDC %	Dh (nm	min.	max.
2	Bei Beginn	111,5	50	223	147	500
	1 Monat, 5°C	96,8	48	194	126	434
	3 Monate, 5°C	99,3	49	199	132	454
1	Bei Beginn	108	47	216	140	546
	1 Monat, 5°C	93,2	48	186	120	468
	3 Monate, 5°C	95,3	49	191	124	498

Dh = hydrodynamischer Durchmesser
PDC = Polydispersitäts-Koeffizient
Rh = hydrdynamischer Radius

g) Physikalische Stabilität

11 Gefrierschutzmittel wurden auf ihre Eignung hin untersucht. Die Resultate sind in den Tabellen 6.1 und 6.2 aufgelistet:

Tabelle 6.1
Lyophilisierung von Verbindung-1-Liposomen

Gefrierschutzmittel	Eutektische Temperatur	Aussehen
Sucrose	–30	weiss, fest, einige kleine Sprünge
Trehalose	–28	weiss, fest, glatte Oberfläche
Lactose	–28	weiss, fest, glatte Oberfläche
Mannitol	–30	weiss, fest, Ablösung einzelner runder Scheiben
Maltose	–27	weiss, fest, zerrissene Kante
zuckerfrei	–	porös, zerbrochen
Fructose	–36	weiss, fest, rauhe Oberfläche
Glucose	–38	weiss, kleine Poren
Galactose	–36	weiss, kleine Poren
Mannose	–37	uneinheitlich
Xylit	–38	uneinheitlich
Sorbit	–33	weiss, porös

Tabelle 6.2
Teilchengrösse von Verbindung-1-Liposomen: Einfluss der Lyophilisierung

Gefrierschutzmittel	Teilchengrösse [mittlerer Durchmesser (nm) ± SD (n = 3)]		Quotient
	vor Lyophilisierung (b)	nach Lyophilisierung (a)	(a/b)
Sucrose	597 (± 174)	205 (± 29)	0,3 (± 0,1)
Trehalose	407 (± 58)	250 (± 35)	0,6 (± 0,1)
Lactose	381 (± 52)	217 (± 19)	0,6 (± 0,1)
Mannitol	224 (± 15)	187 (± 12)	0,8 (± 0,1)
Maltose	209 (± 8)	188 (± 16)	0,9 (± 0,1)
zuckerfrei	274 (± 15)	338 (± 31)	1,2 (± 0,1)
Glucose	377 (± 60)	200 (± 32)	0,5 (± 0,2)
Galactose	391 (± 15)	265 (± 60)	0,7 (± 0,1)
Fructose	304 (± 40)	241 (± 30)	0,8 (± 0,1)
Mannose	398 (± 50)	331 (± 30)	0,8 (± 0,1)
Xylit	320 (± 4)	250 (± 16)	0,8 (± 0,1)
Sorbit	373 (± 57)	139 (± 10)	0,4 (± 0,1)

Verbindung-1-Liposomen wurden zubereitet in Konzentrationen von:
Verbindung 1 = 1.5 mg/ml
Sojabohnen-Lecithine = 15 mg/ml
Gefrierschutzmittel = 4%

h) IR/ATR Spectroskopie

Es wurden ex-situ-Versuche an Multidoppelschichtmembranen mit einem Verbindung-1-Lipid-Verhältnis von 1:2 und ohne die Verwendung eines hohe Konzentrationen von Elektrolyten enthaltenden Puffers duchgeführt. In diesen Liposomen wurde das stoichiometrische Verhältnis von Verbindung 1 zu den Lipiden experimentell bestätigt, d.h. eine gleichmässige Verteilung des Wirkstoffs und der Phospholide wird in den Doppelschichtmembranen aufrecht erhalten. Ein unerwartetes Ergebnis war, dass die Ver-

bindung 1 protoniert wird, wenn sie in dem Lipidmembran eingebaut wird, obwohl die Form der freien Base verwendet wurde.

Basierend auf den experimentell ermittelten dichroitischen Verhältniszahlen wurde der Winkel zwischen der Achse des Moleküls der Verbindung 1 und der senkrechten Linie auf die Membranfläche analysiert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist die Verbindung parallel zu den Kohlenwasserstoffketten der Lipide angeordnet und weist eine Abweichung von 0°–30° von der senkrechten Linie auf. Die Orientierung der Verbindung 1 und von POPC werden durch die Computermodelldarstellung in Zeichnung 2 illustriert.

i) HPLC Analyse

Die Beladung mit Wirkstoff, d.h. die Konzentration von Verbindung 1 pro ml Liposomen wurde durch HPLC festgestellt: Spheri-5 RP 18 Säulen stammten von Brownlee Labs; die Pumpe, U.V.-Detektor und automatischer Probensammler von Kontron. Als mobile Phase wurde Acetonitril/Wasser/Triethylamin (800/200/l) verwendet. Die Probenvorbereitung vor dem Aufbringen auf die Säulen musste mit grösster Vorsicht vorgenommen werden: neutrale Liposomen (ohne Ladung) sind naturgemäss unstabil. Es kann aber die Aggregation und Sedimentation verhütet werden, indem man die Proben im Verhältnis 1:1 mit 50%igem Methanol verdünnt.

Beispiel 2: Herstellung von Liposomen

(Verbindung 1; Phasenübergangstemperatur oberhalb der Raumtemperatur)

Liposomen, welche eine Phasenübergangstemperatur (Tc) oberhalb der Raumtemperatur haben, werden gemäss der Beschreibung von Beispiel 1 hergestellt, wobei aber anstelle von PC und DMPG Distearoyl-PC (DSPC) und Distearoyl-PG (DSPG) eingesetzt werden. In einer weiteren Variante werden DSPC und DSPG durch hydriertes Phosphatidylcholin (HPC) ersetzt. Der Hydratisierungs-, Homogenisierungs- und Filtrationsschritt werden bei Temperaturen oberhalb Tc durchgeführt. Man erhält vergleichbare Resultate wie sie im Beispiel 1 beschrieben sind.

Beispiel 3: Biologische Wirkung von Liposomen gegen Candidiasis

(Verbindung; in vivo, systemische Candidiasis)

Liposomen von Verbindung 1 (POPC/PS, Gewichtsverhältnis 7:3) werden in einem Maus-Modell für innere Pilzinfektionen gegen systemische Candidiasis geprüft: Mäuse (Balb/C) werden auf intravenösem Weg mit Candida albicans NRB in einer Konzentration von 4×10^5 Zellen über die Schwanzvene infiziert. Zwei i.v. Behandlungen werden an den Tagen 3 und 4 nach der Infektion mit 0,5 mg der liposomalen Verbindung 1 pro kg vorgenommen. Das Überleben der Tiere wird bis zum Tag 21 beobachtet. Zählungen der Candida-Herde an den Organen werden in Leber und Nieren durchgeführt.

Überraschenderweise überlebten 10 von 20 Tieren den 21-igsten Tag. Alle infizierten, aber unbehandelten Kontrolltiere starben am achten Tag. Folglich wird das Überleben von 50% der Tiere vom neunten bis mindestens zum 21-igsten Tag in diesem Candidamodell durch die geringe Dosis von 0,5 mg/kg verlängert.

Die Auszählung von Candida-Herden in Leber und Niere wurde bei Mäusen durchgeführt, welche mit der liposomalen Verbindung 1 an den Tagen 5 und 10 nach der Infektion behandelt worden waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 7
Auszählung von Candida-Herden in den Organen Leber und Niere

Tag	Leber	Niere
5	160 ± 74	302 ± 68
10	62 ± 32	126 ± 93
Ein markanter Rückgang am 10. Tag ist festzustellen.		

Ein alternativer Test wird wie oben beschrieben durchgeführt, wobei aber Candida in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen verwendet wird. Die Liposomen werden dabei an den Tagen 1, 3 und 5 verabreicht.

Beispiel 4: Herstellung von Liposomen

(Verbindung 1; technischer Massstab)

Liposomen der gleichen Zusammensetzung wie in Beispielen 1 und 2 erwähnt, werden in dem 1-Stu-

fen-Herstellungsverfahren von M. Brandl et al. (Drug Dev. and Ind. Pharm. 16 [1990] 2167) hergestellt, wobei man eine Superdispax Homogenisierung und eine nachfolgende Behandlung mit einem Microfluidizer anwendet. Gemäss diesem Verfahren werden 1 Liter eines 20 mM Phosphatpuffers pH 6,5, welcher 4,5% Lactose enthält, in einem Superdispax-Homogenisierapparat homogenisiert. 35 g PC, 15 g DMPG und 5 g der Verbindung 1 werden in der Lösung bei einer maximalen Dispergiergeschwindigkeit (15.000 Upm) dispergiert. Nach einer halben Stunde beträgt die durchschnittliche Teilchengrösse 200 nm. Die Liposomen werden anschliessend in einen Microfluidizer überführt und weiter homogenisiert. Durch diese Massnahme wird die Teilchengrösse der Liposomen auf 90 ± 10 nm reduziert.

Wenn man anstelle von PC und DMPG die Lipide HPC und DSPG im obigen Beispiel anwendet und die Temperatur des Verfahrens auf 70°C erhöht, erhält man Liposomen mit einer durchschnittlichen Teilchengrösse von 135 nm.

Beispiel 5: Herstellung eines liposomalen Gels

(Verbindung 1)

2 g der Verbindung 1 (in Form der freien Base) werden zusammen mit 20 g Sojabohnen-Phosphatidylcholin (PC), 4 g Cholesterin und 0,2 g α-Tocopherol in 10 g Propylen-glykol at 50°C gelöst (organische Lösung A). Man lässt die organische Lösung A auf 25°C abkühlen. In einem getrennten Ansatz werden 62 g einer isotonischen Lösung vom 20 mM Phosphatpuffer pH 6,5 in einem Superdispax-Homogenisierapparat gerührt und in diese Lösung 0,2 g p-Hydroxybenzoesäure-methylester, 0,02 g p-Hydroxybenzoesäure-isopropylester und 0,15 g Na-EDTA gelöst (wässrige Lösung B). Die wässrige Lösung B wird bei einer Geschwindigkeit von 3000 Upm gerührt. Dann wird die organische Lösung A der gerührten, wässrigen Lösung B in einer Geschwindigkeit von 1,0 ml/min. zugesetzt. Es bilden sich Liposomen mit einer Teilchengrösse von weniger als 1000 nm. Bei geringerer Rührgeschwindigkeit setzt man 0,5 g Hydroxypropylmethylcellulose zur liposomalen Suspension zu, wodurch sich ein Gel bildet. Das Gel kann in Tuben abgefüllt werden.

Beispiel 6: Pulmonale Anwendung mittels eines Zerstäubers

(Verbindung 1)

Das Experiment wird unter Verwendung eines Zwillingsimpaktors durchgeführt. Derartige Apparate sind in Hallworth et al., J. Pharm. Pharma 39 966–972 (1987) als «Type 11 Twin Impinger» und unter der Bezeichnung «Glass Impinger» in der British Pharmacopoeia 1988, 11, Appendix XVII C (A204–A207) beschrieben. Eine Liposomensuspension, welche die Verbindung 1 in Form der freien Base zusammen mit einer Phospholipidmischung von PC (10,5 mg/ml) und DMPG (4,5 mg/ml) enthält, und eine Liposomensuspension, welche die Verbindung 1 in Form der freien Base zusammen mit einer Phospholipidmischung aus H (hydriert) (HPC) (10,5 mg/ml PBSL) und aus DSPG (4,5 mg/ml PBSL), wobei beide Liposomensuspensionen eine mittlere Teilchengrösse zwischen 100 nm und 200 nm haben, werden zerstäubt und 30 Minuten lang in einen Zwillingsimpaktor mit einem Luftdurchsatz von 60 l/min. eingeleitet. Die aus den einzelnen Teilen des Zwillingsimpaktors zurückgewonnenen Mengen werden mittels Photospektrometrie gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass kein wesentlicher Unterschied zwischen der Verteilung der Liposomensuspension, die verschiedene Phospolipidmischungen (mit verschiedenen Übergangstemperaturen) haben, auftritt. In beiden Fällen wird mehr als 50% aus der unteren Kammer des Impaktors zurückgewonnen, was einer hohen Transportrate in die Alveolen entspricht (siehe Zeichnung 3).

Einfluss der Zerstäubung auf die Teilchengrösse: Um die Auswirkung der Zerstäubung auf die Grösse der Liposomen an verschiedenen Phospholipidmischungen und verschiedenen Übergangstemperaturen zu untersuchen, werden die Suspensionen in einem «Pari Inhalation Standard Gerät» zerstäubt. Es werden die obigen Liposomenzusammensetzungen verwendet, wobei diese jedoch eine mittlere Teilchengrösse von über 500 nm haben. Zu verschiedenen Zeiten werden Proben aus dem Behälter des Zerstäubers entnommen und durch Laserlichtstreuung vermessen. Man beobachtet, dass die Grösse der Liposomen in beiden Fällen innerhalb von 10 Minuten rasch abnimmt und nach 12 Minuten eine Grösse von ungefähr 150 nm – 200 nm erreicht (Zeichnung 4).

Anschliessend wird die durchschnittliche Grösse der Liposomen, welche den Zerstäuber verlassen, mittels Laserlichtstreuung gemessen. Man stellt fest, dass alle Liposomen, die den Zerstäuber verlassen, eine mittlere Grösse von annähernd zwischen 90 nm und 140 nm besitzen.

Es kann geschlossen werden, dass die Liposomen beider Mittel, die in ein Aerosol überführt werden, klein sind und dass die Teilchengrösse nicht direkt von der Teilchengrösse der Liposomen abhängt, welche in den Behälter des Zerstäubers eingefüllt werden. Überraschenderweise wird die Grösse der MLV im Gel-Status (HPC/DSPC) genau so schnell verkleinert wie die Grösse der MLV in einem flüssigen Status (PC/DMPC), obwohl die Zerstäubung bei Raumtemperatur stattfindet, also weit unterhalb der Gel/Flüssigkeit-Phasenübergangstemperatur der Liposomen im Gel-Status.

Beispiel 7: Biologische Wirksamkeit von Liposomen gegen Aspergillosis

Die biologische Wirksamkeit von 2 Liposomensorten, die gemäss dem obigen Beispiel 4 erhalten werden, wird in einem Maus-Modell für Pilzinfektionen der Lunge gegen Aspergillosis mit Cortison-induzierter Immunschwäche untersucht: 20 g schwere weibliche Mäuse (ICR) werden für 3 Tage subcutan mit 2,5 mg Cortison-acetat behandelt, beginnend einen Tag vor der Infektion, um eine Immunschwäche zu erzeugen. Unter einer leichten Anästhesie mit Pentobarbital werden die Mäuse intranasal mit 1,25 × 10^6 Sporen Aspergillus fumigatus-ATCC 13073 infiziert, welche in 60 Microliter Kochsalzlösung mit Tween 80 suspendiert worden sind. Die Behandlung mit den Liposomen wird 5 Tage vor der Infektion begonnen und jeden Tag wiederholt bis insgesamt 11 Behandlungen vorgenommen worden sind. Die Chemotherapie wird durchgeführt, indem nur die Nase den zerstäubten Liposomen für 30 Minuten pro Tag ausgesetzt wird. Jede Versuchsgruppe besteht aus 15 Tieren einschliesslich Kontrollgruppen in denen nicht-infizierte/nicht-behandelte, infizierte/nicht-behandelte und infizierte/Placebo-behandelte Tiere einschliessen. Die Bewertung des Tests wird 20 Tage nach der Infektion vorgenommen, indem die Überlebensrate und das Körpergewicht der geprüften Tiere festgestellt wird.

Angewendete tägliche Dosen der Liposomen der Verbindung der Formel I von beispielsweise zwischen 0,01 und 1 mg/kg verlängern das Überleben der behandelten Mäuse oder es kann eine Verbesserung des Krankheitszustandes der Aspergillosis beobachtet werden.

Dieses Testverfahren beruht auf einem Maus-Modell für Lungen-Aspergillosis, wie es von S. Allen et al. beim 9th International Symposium on Future Trends in Chemotherapy, Geneva, Switzerland (1990), in «Aerosol Amphotericine B Chemotherapy in an Immune Compromised Murine Model» beschrieben worden ist.

Liposomale Zubereitungen, welche die erfindungsgemässen Liposomen enthalten, zeigen eine pharmakologische Aktivität und sind deshalb als Pharmazeutika nützlich.

Im Speziellen sind sie für die Behandlung von systemischen Pilzinfektionen indiziert. Diese Wirksamkeit tritt beispielsweise auf wenn mit Candida systemisch infizierte Mäuse mit erfindungsgemässen Liposomen in einer Dosis zwischen ungefähr 0,1 mg/kg bis ungefähr 2 mg/kg der liposomalen Verbindung der Formel I behandelt werden, z.B. in der im Beispiel 3 beschriebenen Weise.

Bei der obigen Indikation wird die geeignete Dosis natürlich in Abhängigkeit von beispielsweise der verwendeten Form des Wirkstoffes, dem Wirt, der Art der Anwendung und der Art und Schwere des Krankheitszustandes schwanken. Jedoch werden im allgemeinen zufriedenstellende Resultate in Tieren zu erwarten sein bei täglichen Dosen von ungefähr 0,1 µg/kg bis ungefähr 10 mg/kg, insbesondere von 0,05 mg/kg bis 1 mg/kg, oder z.B. 0,1 bis 1 mg/kg Körpergewicht des Tieres der Verbindung der Formel I in liposomaler Form. Bei Menschen ist die angezeigte tägliche Dosis im Bereich von ungefähr 0,1 mg bis ungefähr 500 mg der Verbindung der Formel I in liposomaler Form, geeignet angewendet beispielsweise in aufgeteilten Dosen bis zu 4 mal pro Tag. Die bevorzugte tägliche Dosis ist von ungefähr 5 mg bis ungefähr 50 mg der Verbindung der Formel I pro Tag.

Weiter sind die liposomalen Zubereitungen im besonderen für die Behandlung von Pilzinfektionen der Lunge indiziert. Diese Wirksamkeit tritt beispielsweise auf bei der Behandlung von pulmonal mit Aspergillus infizierten Mäusen mit erfindungsgemässen Liposomen durch Behandlung mit einer zerstäubten liposomalen Zubereitung für 30 Minuten pro Tag, wie beispielsweise in Beispiel 7 beschrieben ist.

Für die obige Indikation wird die geeignete Dosis natürlich in Abhängigkeit beispielsweise des Wirts und der Beschaffenheit und Schwere des behandelten Krankheitszustandes schwanken. Im allgemeinen werden jedoch zufriedenstellende Resultate in Tieren bei täglicher Behandlung mit einer zerstäubten liposomalen Form der Verbindung der Formel I und inhalierten Dosen von ungefähr 0,1 mg/kg bis ungefähr 10 mg/kg Körpergewicht des Tieres zu erwarten sein.

Beim Menschen liegt die angezeigte tägliche Dosis zwischen ungefähr 10 mg bis ungefähr 1000 mg/Tag bei geeigneter Anwendung beispielsweise in aufgeteilten Dosen bis zu 4 mal pro Tag. Bevorzugte täglicher Dosen liegen zwischen ungefähr 20 mg bis ungefähr 400 mg, beispielsweise zwischen ungefähr 100 mg bis 200 mg pro Tag.

Weiter sind die liposomalen Zubereitungen im Einzelnen für die topische Behandlung von Pilzinfektionen der Haut indiziert. Die geeignetsten Anwendungsformen sind Gele, Cremen und Lotionen, die die liposomalen Zubereitung der Verbindung der Formel I enthalten, beispielsweise die liposomalen Gele wie sie gemäss Beispiel 5 hergestellt werden, beispielsweise für die gleichen Indikationen die für andere topische Mittel bekannt sind, z.B. Pilzinfektionen und in den gleichen Dosierungen wie beispielsweise durch klinische Standardtest bestätigt wird. Typische effektive Dosen sind erreicht, wenn die Konzentration des Wirkstoffs im behandelten Hautgewebe zwischen 10 und 10 000 ng/cm², beträgt. Bevorzugte Hautgewebekonzentrationen liegen zwischen 500 und 2000 ng/cm² beispielsweise bei 1000 ng/cm² wie z.B. durch pharmakologische Standardtest angezeigt wird. Es können jedoch auch höhere und tiefere Dosierungen wirksam sein und durch Standardtest festgestellt werden. Beispielsweise können die wirksamen Konzentrationen in der behandelten Haut erreicht werden, wenn beispielsweise die Verbindung der Formel I in Form von z.B. eines 2%igen erfindungsgemässen liposomalen Gels auf dem infizierten Bereich verteilt wird, z.B. 5 mg des Wirkstoffs pro Tag auf einer Hautfläche von ungefähr 100 Quadratzentimetern.

Die Anwendung kann peroral, topisch oder parenteral erfolgen. Vorzugsweise ist sie topisch oder parenteral, insbesondere parenteral, besonders aber pulmonal.

Die parenterale Anwendung erfolgt vorzugsweise in Form einer Suspension in einer pharmazeutisch annehmbaren Lösung wie einer sterilen isotonischen wässrigen Lösung. Solche Lösungen sind bereits gebrauchsfertig erhältlich oder sie können aus vorgefertigten Komponenten hergestellt werden.

Bei der peroralen Verabreichung werden vorzugsweise verkapselte Liposomen eingesetzt, wodurch die Liposomen vor der Verdauung im Magen und Darm geschützt sind bevor sie aus den Kapseln freigesetzt werden.

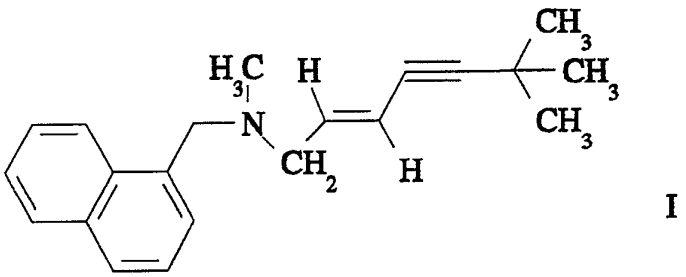
Die topische Anwendung erfolgt mittels liposomaler Zubereitungen wie Lotionen, Gelen, Cremen oder Salben. Die lokale Anwendung kann auch auf dem Weg der Inhalation erfolgen besonders in die Lunge, beispielsweise durch Verwendung eines geeigneten Zerstäubers oder eine Sprühvorrichtung. Die Zerstäubung von liposomalen Suspensionen kann in einem Standardzerstäuber, der mit Pressluft oder Ultraschall betrieben wird, erfolgen, obwohl auch andere Methoden der Zerstäubung angewendet werden können, beispielsweise unter Druck stehende dosierte Aerosole oder Trockenpulver-Formulierungen in geeigneten Vorrichtungen. Die Liposomensuspension kann auch durch Lyophilisierung oder Sprühtrockung getrocknet werden. Das erhaltene Pulver kann in einem geeigneten Treibgas wie einem Fluorchlorkohlenwasserstoff suspendiert werden oder aus einem Pulverinhalationsapparat inhaliert werden. Wenn die Verbindung der Formel I in Liposomen verkapselt ist, kann eine lokalisierte Wirkung in den Atemwegen unter Vermeidung ungewünschter systemischer Reaktionen erreicht werden.

Solche Zubereitungen können in üblicher Weise hergestellt werden. Einzeldosisformen enthalten z.B. zwischen ungefähr 0,025 mg bis ungefähr 250 mg der Verbindung der Formel I in liposomaler Form.

Die Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren zur Behandlung von systemischen Pilzinfektionen bereit, das darin besteht, dass man einen Patienten, der eine solche Behandlung benötigt, mit einer pharmazeutisch wirksamen Menge an Liposomen behandelt, welche als Wirkstoff eine Verbindung der Formel I gemäss obiger Definition enthält.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zubereitung enthaltend die Verbindung der Formel I



I

in Form der freien Base oder in Form eines Säureadditionssalzes, als Aktivstoff, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung Liposomen umfasst, die die Verbindung der Formel I enthalten.

2. Zubereitung gemäss Anspruch 1, welche als Phospholipidkomponenten POPC oder einer Mischung von POPC und POPG oder DOPG oder DOPS enthält.

3. Zubereitung gemäss Anspruch 1 oder 2 welche als Phospholipidkomponente DMPC oder einer Mischung von DMPC und DMPG enthält.

4. Zubereitung gemäss Anspruch 1, welche Phospholipidkomponenten enthält, die hydrierte Phospholipide sind und einen Schmelzpunkt oberhalb von +42°C haben.

5. Zubereitung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 worin das Gewichtsverhältnis von neutralen und negativ geladenen Phospholipiden ungefähr 7:3 beträgt.

6. Zubereitung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5, worin das Gewichtsverhältnis des Aktivsstoffs zu neutralen zu negativ geladenen Phospholipiden ungefähr 1/10,5/4,5 beträgt.

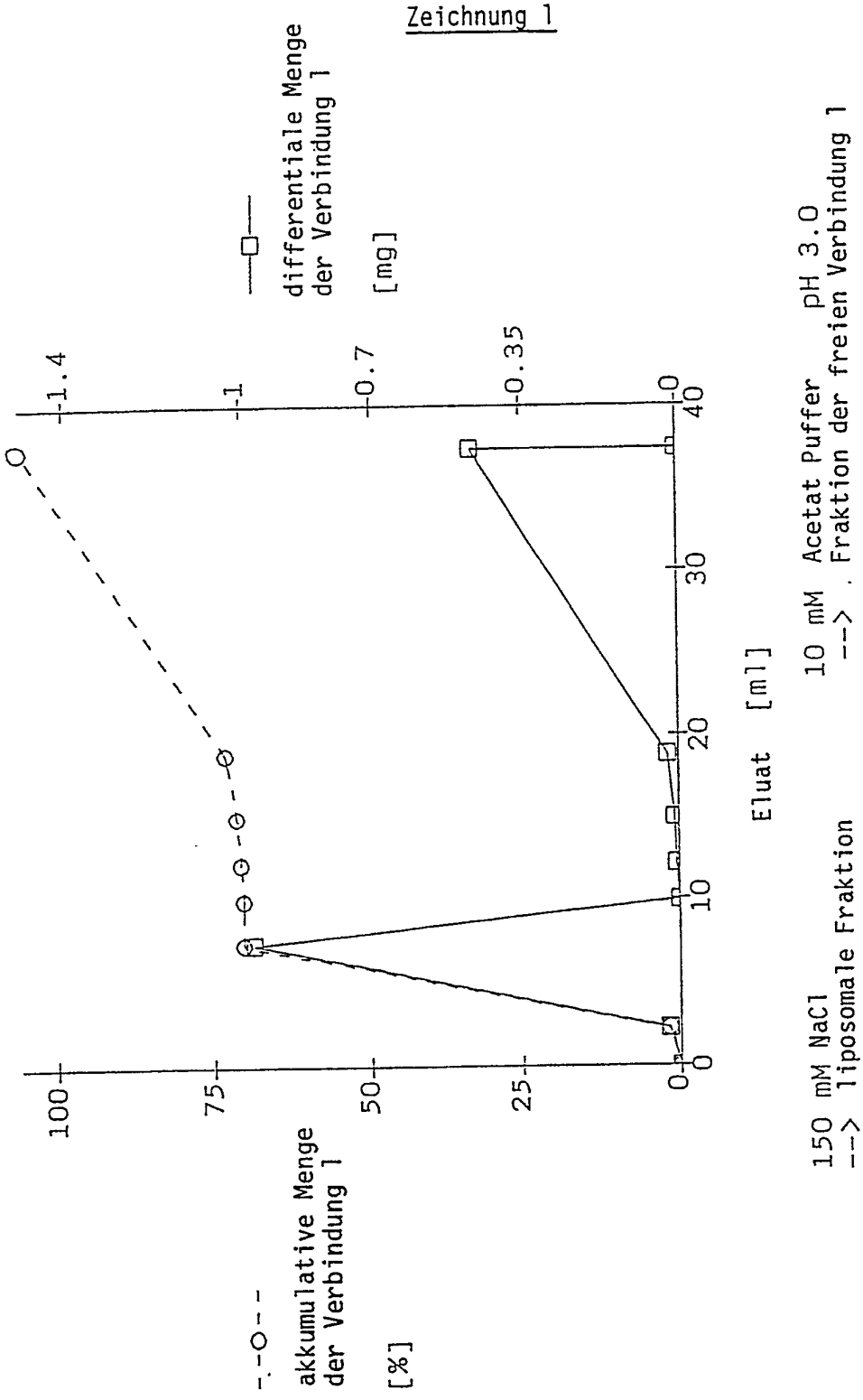
7. Zubereitung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 6, die in lyophilisierer Form vorliegt.

8. Verfahren zur Herstellung einer Zubereitung gemäss Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel I gemäss Anspruch 1 mit einem geeigneten liposomenbildenden Material mischt, und Liposomen bilden lässt.

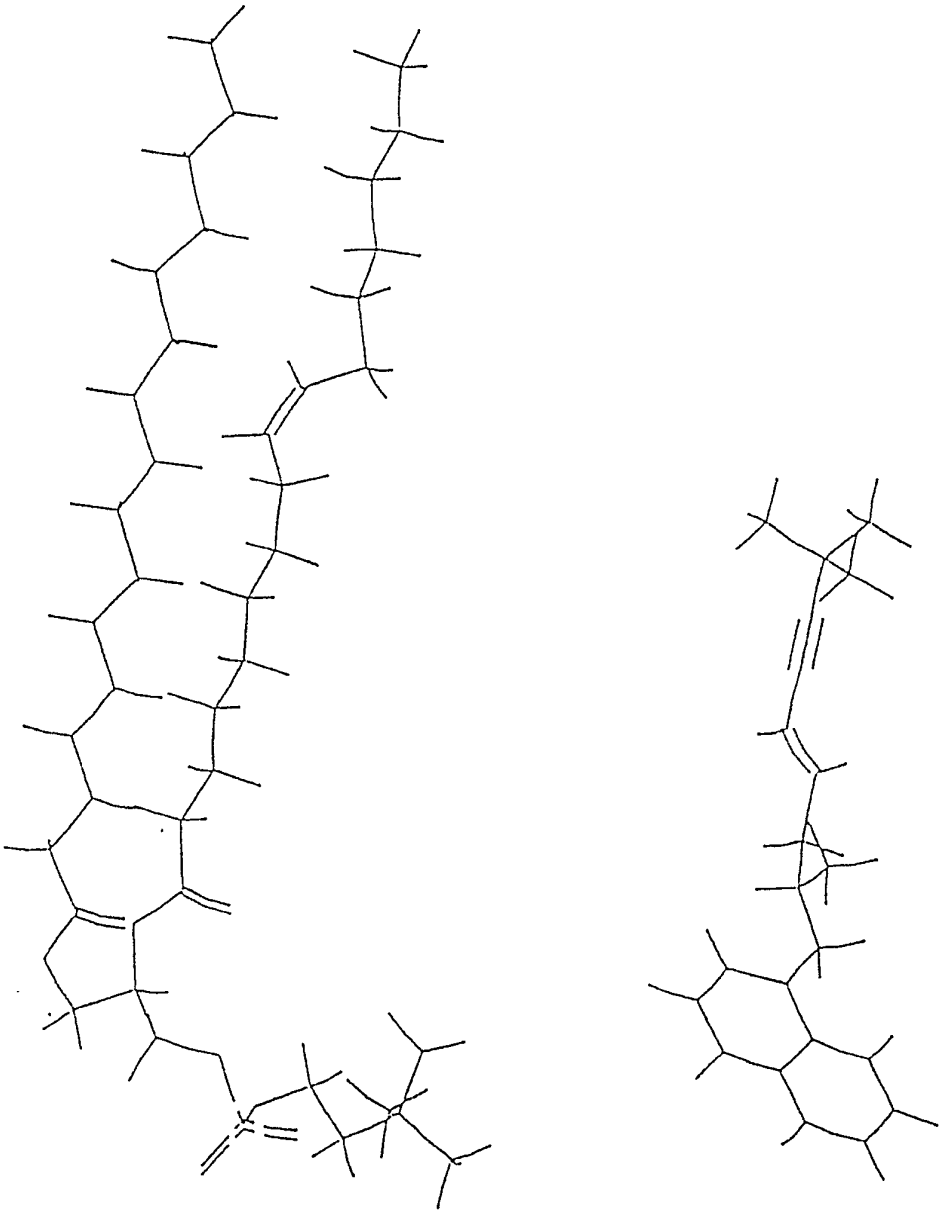
9. Zubereitung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 6 enthaltend weitere pharmazeutisch annehmbare Träger oder Verdünnungsmittel.

10. Zubereitung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7 und 9, enthaltend zudem PE-PEG.

Zeichnung 1

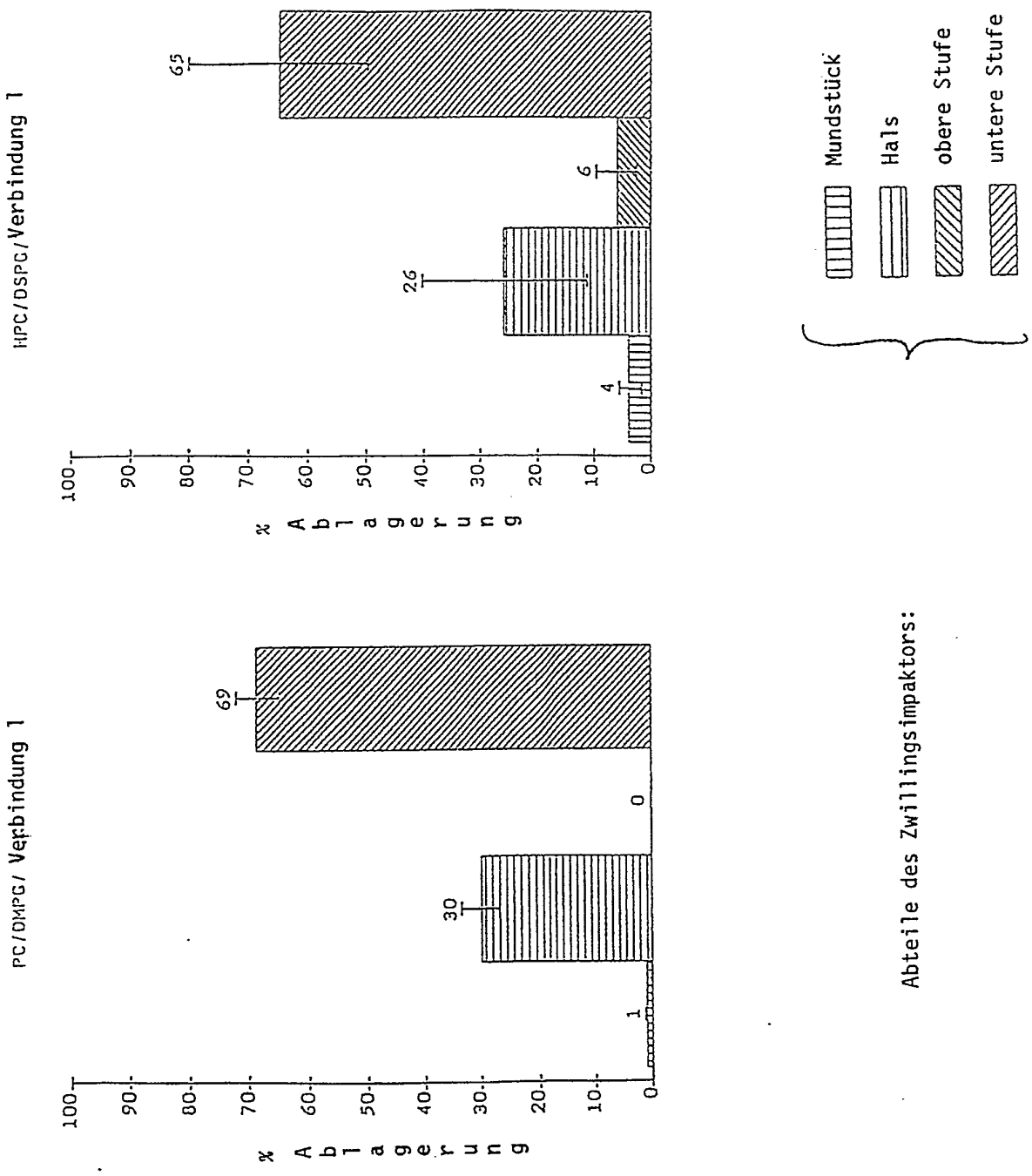

differentiale Menge der Verbindung 1
[mg]
1.4
1
0.7
0.35
0
akkumulative Menge der Verbindung 1
[%]
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
Eluat [ml]
150 mM NaCl
--> liposomale Fraktion
10 mM Acetat Puffer pH 3.0
--> Fraktion der freien Verbindung 1

Zeichnung 2

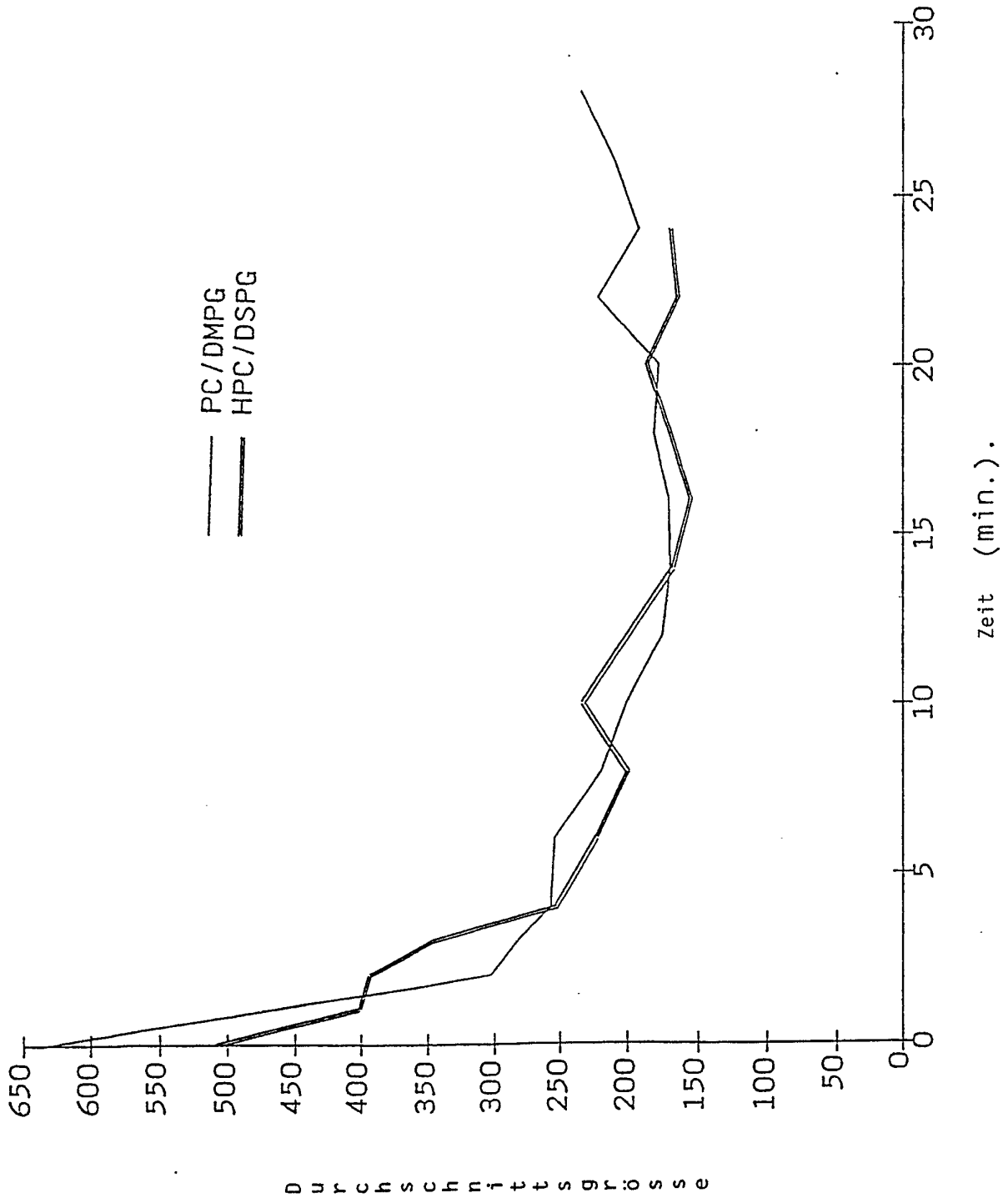


Verbindung 1

Zeichnung 3


HPC/DSPG/Verbindung 1
65
6
26
4
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Ablagerung
PC/DMPG/ Verbindung 1
69
0
30
1
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Ablagerung
Mundstück
Hals
obere Stufe
untere Stufe
Abteile des Zwillingsimpaktors:

Zeichnung 4


PC/DMPG
HPC/DSPG
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
5
10
15
20
25
30
Durchschnittsgrösse
Zeit (min.).