



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 30 965 T2** 2007.05.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 173 222 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 30 965.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/10922**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 928 321.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/064484**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 47/48** (2006.01)
C07D 487/14 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

130897 P **23.04.1999** **US**

(73) Patentinhaber:

**Alza Corp., Mountain View, Calif., US; Hadasit
Medical Research Services and Development Ltd.,
Jerusalem, IL**

(74) Vertreter:

Berendt und Kollegen, 81667 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ZALIPSKY, Samuel, Redwood City, CA 94061, US;
GABIZON, A., Alberto, 96920 Jerusalem, IL**

(54) Bezeichnung: **KONJUGATE ENTHALTEND EINE SPALTBARE BINDUNG ZUR ANWENDUNG IN EINEM LIPOSOM**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das aus einer hydrophoben Gruppe, einer spaltbaren Bindung und einem therapeutischen Mittel zusammengesetzt ist. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Konjugate, die ein Lipid, eine spaltbare Bindung und ein Arzneimittel, das in einer liposomalen Formulierung enthalten ist, umfassen. Die Konjugate sind unter milden thiolytischen Bedingungen *in vivo* zur Freisetzung des Arzneimittels in einem nicht modifizierten Zustand spaltbar.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Liposomen sind geschlossene Lipidvesikel, die für eine Vielzahl therapeutischer Zwecke und insbesondere für den Transport therapeutischer Mittel zu einer Targetregion oder -zelle durch systemische Administration von Liposomen verwendet werden. Liposomen, die eine Oberfläche auf die Ketten eines wasserlöslichen, bioverträglichen Polymeren, insbesondere Polyethylenglykol aufpolymerisiert sind, sind wichtige Arzneimittelträger. Diese Liposomen offenbaren eine verlängerte Blutkreislauflebensdauer gegenüber Liposomen denen die Polymerschicht fehlt. Die gepfropften Polymerketten schützen und maskieren die Liposome, wobei nichtspezifische Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen minimiert werden. Dies wiederum verlangsamt die Rate mit der sich die Liposomen *in vivo* auflösen oder eliminiert werden, weil die Liposomen unerkannt durch Makrophagen oder andere Zellen des retikuloendothelialen Systems zirkulieren. Außerdem neigen die Liposomen infolge des sogenannten erhöhten Permeabilitäts- oder Retentionseffekt an den Stellen der geschädigten oder erweiterten Gefäßversorgung, z.B. Tumoren oder Entzündungsstellen, zu akkumulieren.

[0003] Eine verlängerte Blutkreislaufzeit ist oft erwünscht, um es den systemisch verabreichten Liposomen zu ermöglichen, ein Targetbereich, -zelle oder -stelle zu erreichen. Zum Beispiel ist eine Blutkreislauflebensdauer von mehr als etwa 12 Stunden für die liposomale Therapie in einem Tumorbereich erwünscht, weil die Liposomen systemisch verteilt werden müssen und dann in den Tumorbereich eindringen.

[0004] Ein Problem, das mit der auf Liposomen basierenden Therapie verbunden ist, ist die Retention des Arzneimittels innerhalb der Liposomen für eine Zeit, die ausreichend für die systemische Verteilung ist. Dieses Problem ist von besonderer Bedeutung, wenn Langzeitliposomen, d.h. Liposomen mit aufgepfropften Polymerketten verabreicht werden. Relativ wenige Arzneimittel können effizient für einen langen Zeitraum geladen und zurückgehalten und nachfolgend freigesetzt werden.

[0005] Ein Ansatz zur Verbesserung der Zurückbehaltung des Arzneimittels ist, Lipiddoppelschichtkomponenten auszuwählen, die die Doppelschicht weniger durchlässig für das eingeschlossene Arzneimittel machen. Jedoch sollte die Lipiddoppelschicht ausreichend durchströmbar sein, so daß das Arzneimittel freigesetzt werden kann, zum Beispiel durch Transport über die Lipiddoppelschicht oder durch Lipidvesikelauflösung zu dem gewünschten Zeitpunkt, z.B. nach Lokalisierung der Targetstelle oder ausreichender Biodistribution.

[0006] Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Arzneimittelretention ist, das Arzneimittel kovalent mit einem Lipid in der liposomalen Lipiddoppelschicht zu verbinden (Waalkes, et al. *Selective Cancer Therap.*, 6: 15–22 (1990); Assi, et al., *Biol. Pharm. Bull.* 21: 766–771 (1998)).

[0007] Es wäre wünschenswert eine Liposomenzusammensetzung herzustellen, die eine lange Blutkreislauflebensdauer aufweist und fähig ist, ein eingeschlossenes Arzneimittel für einen gewünschten Zeitraum zurückzuhalten, aber in der Lage ist, das Arzneimittel nach Bedarf freizusetzen. Ein Ansatz, der im Stand der Technik zum Erreichen dieser Merkmale beschrieben ist, ist ein Liposom aus einem nicht-vesikelbildenden Lipid, wie Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) und einem Lipiddoppelschicht stabilisierendem Lipid, wie Methoxy-polyethylenglycol-Distearoylphosphatidylethanolamin (m-PEG-DSPE) zu bilden (Kirpotin D., et al., *FEBS Lett.* 388: 115–118 (1996)). Bei diesem Ansatz wird mPEG über eine spaltbare Bindung mit dem DSPE verbunden. Die Spaltung der Bindung destabilisiert das Liposom für eine schnelle Freisetzung des Liposomengehalts.

[0008] Labile Bindungen für die Verbindung von PEG-Polymerketten mit Liposomen sind beschrieben (US-Patente Nr. 5013556, 5891468; WO 98/16201). Die labile Verbindung in diesen Liposomenzusammensetzungen setzt die PEG-Polymerketten aus den Liposomen frei, zum Beispiel um eine Oberfläche, die mit Targetliganden verbunden ist, zu enthüllen oder um die Fusion der Liposome mit Targetzellen auszulösen.

[0009] Bis heute wurden jedoch Mittel zur Freisetzung von Polymerketten aus Liposomen unter Bedingungen,

die für die in vivo Anwendung geeignet sind, nicht erreicht. Zum Beispiel benötigen einige lösbare Bindungen ein potentes thiolytisches Mittel, wie zum Beispiel 1,4-Dithiothreitol, um die Freisetzung der Polymerketten zu erreichen. Dieses Reduktionsmittel ist für die in vivo Verwendung nicht akzeptabel. Ein weiteres Problem mit bekannten lösbaren Bindungen, die PEG mit einem Liposomenlipid verbinden, besteht darin, daß die Spaltung der lösbaren Bindungen ein unnatürliches und nicht erwünschtes modifiziertes Lipid erzeugt. Demgemäß bestand ein Bedarf im Stand der Technik für eine lösbare Bindung, die für die in vivo Verwendung geeignet ist und die, nach der Spaltung das Arzneimittel oder das therapeutische Mittel in seiner natürlichen, nicht modifizierten Form liefert.

[0010] In der EP 0317957 beschreibt Senter einer Wirkstoff-Antikörper-Vorstufe, bei der der Antikörper mit dem Arzneimittel unter Verwendung eines Disulfidbenzylcarbamat- oder -carbonatlinkers verbunden ist und die Reduktion der Disulfidbindung bewirkt die Freisetzung des Arzneimittels. Die Lehre von Senter betrifft speziell unter Einsatz eines Reduktionsmittels wie 1,4-Dithiothreitol, Glutathion, NADH und NADPH die Spaltung eines Arzneimittel-Ligand-Vorstufen-Moleküls. Das Verhalten eines solchen Linkers, wenn er in ein Liposom, das durch den Blutstrom zirkuliert, eingebracht ist, kann auf der Basis der Offenbarung von Senter nicht vorhergesagt werden. Zum Beispiel kann der Linker zwischen dem Polymer und dem Lipid in der PEG-Schicht verborgen oder maskiert sein. Es ist relativ leicht, sich eine einzelne Arzneimittel-Ligand-Vorstufe, wie bei Senter, vorzustellen; jedoch ist die Freisetzung des Linkers, wenn er Teil einer dicht gepackten Barriere, wie in einer Liposomenoberflächenschicht von Polymerketten ist, wenig vorhersehbar.

[0011] Wie oben ausgeführt, ist eine ausgedehnte Blutkreislauflebensdauer ein erwünschtes Merkmal von PEG-beschichteten Liposomen, wobei Blutkreislauflebensdauern von mehr als 12 Stunden für eine liposomale Therapie in einer Tumorregion bevorzugt sind. Die Offenbarung von Senter liefert keine Anleitung im Hinblick auf die Freisetzungskinetiken eines Konjugats, das in ein Liposom unter endogenen reduzierenden Bedingungen eingebracht ist, wie zum Beispiel während der Blutzirkulation des Liposoms.

[0012] Die WO 97/36904A offenbart Mitomycin C Derivate zur Inhibierung von Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen, die Mitomycin C, das mit einer Docosahexanoylgruppe derivatisiert ist, enthält.

[0013] Die EP 0510197A offenbart eine Fettemulsion enthaltend Mitomycin C, die über eine carbonylenthaltende Verbindungsgruppe mit einer C₃₋₂₅-Hydrocarbongruppe derivatisiert ist.

[0014] Die JP 01 113391 offenbart Konjugate von Mitomycin C und einer Fettsäure.

[0015] Die FR 2254336A offenbart Mitomycin C-Derivate, die Mitomycin C, das mit einer C₉₋₂₉-Hydrocarbongruppe derivatisiert ist, enthält, die über eine carbonylenthaltende Bindungsgruppe hydroxylsubstituiert sein kann.

Zusammenfassung der Erfindung

[0016] Demgemäß ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung eine Liposomenzusammensetzung bereitzustellen, bei der das Arzneimittel für einen gewünschten Freisetzungszeitraum aus dem Liposom zurückgehalten wird.

[0017] Es ist das Ziel der Erfindung ein Konjugat zur Verwendung in einem Liposom bereitzustellen, wobei das Konjugat zusammengesetzt ist aus einer hydrophoben Gruppe zur Verankerung in der Lipiddoppelschicht, einer Verbindung, die unter milden thiolytischen Bedingungen spaltbar ist und einem therapeutischen Mittel.

[0018] Die Erfindung betrifft ein Konjugat zur Verwendung in einem liposomalen Vehikel zur Arzneimittelfreisetzung, das Konjugat hat die allgemeine Strukturformel:



wobei L eine Distearoylglycerin-Gruppe ist, die zur Einlagerung in eine liposomale Lipiddoppelschicht geeignet ist, R¹ stellt eine Mitomycin A- oder Mitomycin C-Komponente dar, die über eine Urethangruppe kovalent an die Dithiobenzylgruppe gebunden ist und wobei die Orientierung der CH₂R¹-Gruppe aus der ortho-Position oder der para-Position ausgewählt wird.

[0019] Mitomycin A und Mitomycin C enthalten eine primäre oder sekundäre Amin-Gruppe, wobei eine Ure-

thanbindung zwischen dem Dithiobenzyl und dem therapeutischen Wirkstoff gebildet wird.

[0020] Ein weiteres Ziel der Erfindung schließt eine Liposomenzusammensetzung ein, umfassend Liposome, die zusammengesetzt ist aus vesikelbildenden Lipiden, die etwa 1 bis etwa 30 Molprozent des Konjugats mit der oben beschriebenen allgemeinen Formel einschließen. Der therapeutische Wirkstoff wird aus dem Konjugat in vivo als Reaktion auf einen physiologischen Zustand oder artifiziell induzierten Zustand freigesetzt.

[0021] Ein anderes Ziel der Erfindung schließt ein Verfahren zum Zurückhalten eines Arzneimittels in einem Liposom ein, umfassend die Herstellung von Liposomen, die zusammengesetzt sind aus einem vesikelbildenden Lipid und aus etwa 1 bis 30 Molprozent des oben beschriebenen Konjugats. Die Liposomen halten wirksam das Arzneimittel in dem Liposomen zurück, bis die Freisetzung aus dem Konjugat als Reaktion auf einen physiologischen Zustand oder artifiziell induzierten Zustand erfolgt.

[0022] Diese und andere Ziele und Ausgestaltungen der Erfindung werden vollständiger gewürdigt, wenn die folgende ausführliche Beschreibung der Erfindung in Verbindung mit den Zeichnungen gelesen wird.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0023] [Fig. 1](#) zeigt ein Synthesereaktionsschema zur Herstellung von para-Diacyldiglyceroldithiobenzylalkohol für die weitere Reaktion mit amin-, hydroxy- und carboxylenthaltenden Arzneimitteln;

[0024] [Fig. 2A](#) zeigt ein allgemeines Reaktionsschema zur Anlagerung eines aminhaltigen Arzneimittels an ein reaktives Diacyldiglyceroldithiobenzylcarbonat;

[0025] [Fig. 2B](#) zeigt die Produkte nach der thiolytischen Spaltung des Konjugates von [Fig. 2A](#);

[0026] [Fig. 6A](#) zeigt ein Synthesereaktionsschema zur Herstellung eines Diacyldiglyceroldithiobenzyl-Mitomycin C-Konjugates;

[0027] [Fig. 6B](#) zeigt die Produkte nach der thiolytischen Spaltung des Konjugates von [Fig. 6B](#);

[0028] [Fig. 9A–Fig. 9C](#) zeigt die Strukturen der drei Lipid-Dithiobenzyl-Mitomycin C-Konjugate, para-Distearyl-DTB-Mitomycin C ([Fig. 9A](#)), para-Dipalmitoyl-DTB-Mitomycin C ([Fig. 9B](#)), und ortho-Dipalmitoyl-DTB-Mitomycin C ([Fig. 9C](#));

[0029] [Fig. 10–Fig. 10B](#) sind HPLC-Chromatogramme für Liposomen zusammengesetzt aus HSPC/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C ([Fig. 10A](#)) und HSPC/Cholesterin/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C ([Fig. 10B](#)), wobei jede Abbildung eine Serie von Chromatogrammen als Funktion der Inkubationszeit der Liposomen in Anwesenheit von Cystein darstellt;

[0030] [Fig. 11](#) ist ein Diagramm, das die Prozent von Mitomycin C zeigt, die aus Liposomen enthaltend HSPC/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (gefüllte Rhomben) und HSPC/Cholesterin/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (gefüllte Kreise) als eine Funktion der Inkubationszeit in Anwesenheit von Cystein freigesetzt werden;

[0031] [Fig. 12A–Fig. 12B](#) sind Diagramme, die die Prozent von Mitomycin C zeigen, die aus Liposomen enthaltend HSPC/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C ([Fig. 12A](#)) und HSPC/Cholesterin/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C ([Fig. 12B](#)) als eine Funktion der Inkubationszeit in Anwesenheit von Cystein bei Konzentrationen von 150 µM (gefüllte Symbole) und von 1,5 mM (leere Symbole) freigesetzt werden;

[0032] [Fig. 13](#) ist ein Diagramm der Wachstumsrate von M109 Zellen, ausgedrückt als Prozentzahl basierend auf dem Wachstum von M109 Zellen in Abwesenheit von Arzneimittel und Cystein; als eine Funktion der Mitomycin C Menge in mM, für freies Mitomycin C (leere Dreiecke), Liposomen zusammengesetzt aus HSPC/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (gefüllte Quadrate) und Liposomen zusammengesetzt aus HSPC/Cholesterin/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (leere Kreise);

[0033] [Fig. 14A](#) ist ein Diagramm der Wachstumsrate von M109 Zellen, ausgedrückt als Prozentzahl basierend auf dem Wachstum von M109 Zellen in Abwesenheit von Arzneimittel und Cystein; als Funktion der Mitomycin C Konzentration in mM. Gezeigt sind Zellen, die mit Mitomycin C in der freien Form (leere Dreiecke) und mit Mitomycin C in freier Form plus 1000 µM Cystein (gefüllte Dreiecke) behandelt wurden. Ebenso sind

Zellen gezeigt, die mit der Liposomenformulierungen zusammengesetzt aus HSPC/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (leere Kreise) und mit Liposomenformulierungen mit zusätzlich zugefügtem Cystein mit Konzentrationen von 150 μM (leere Rhomben), 500 μM (gefüllte Kreise und 1000 μM (leere Quadrate) behandelt wurden;

[0034] **Fig. 14B** ist ein Diagramm der Wachstumsrate von M109 Zellen, ausgedrückt als Prozentzahl basierend auf dem Wachstum von M109 Zellen in Abwesenheit von Arzneimittel und Cystein; als Funktion der Mitomycin C Konzentration in mM. Gezeigt sind Zellen, die mit Mitomycin C in der freien Form (leere Dreiecke) und mit Mitomycin C in freier Form plus 1000 μM Cystein (gefüllte Dreiecke) behandelt wurden. Ebenso sind Zellen gezeigt, die mit der Liposomenformulierungen zusammengesetzt aus HSPC/Cholesterin/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (leere Kreise) und mit Liposomenformulierungen mit zusätzlich zugefügtem Cystein mit Konzentrationen von 150 μM (leere Rhomben), 500 μM (gefüllte Kreise und 1000 μM (leere Quadrate) behandelt wurden;

[0035] **Fig. 15** ist ein Diagramm, das die prozentuale Zunahme der Cytotoxizität (bestimmt durch $\text{IC}_{50_{\text{kein Cystein}}}/\text{IC}_{50_{\text{Cystein}}} \times 100$) von freiem Mitomycin C (gefüllte Quadrate), Mitomycin C verbunden mit Liposomen umfassend HSPC/Cholesterin/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (gefüllte Kreise) und Liposomen umfassend HSPC/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (leere Dreiecke) von M109 Zellen in vivo bei verschiedenen Konzentrationen an Cystein, zeigt;

[0036] **Fig. 16** ist ein Diagramm, das die Konzentration von Mitomycin C in Rattenblut als eine Funktion der Zeit in Stunden nach intravenöser Injektion von freiem Mitomycin C (leere Quadrate), Liposomen umfassend HSPC/Cholesterin/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (gefüllte Rhomben) und Liposomen umfassend HSPC/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (gefüllte Kreise) zeigt; und

[0037] **Fig. 16B** ist ein Diagramm, das die prozentual injizierte Dosis zeigt, die im Rattenblut als Funktion der Zeit in Stunden nach intravenöser Injektion von freiem Mitomycin C (leere Quadrate), Liposomen umfassend HSPC/Cholesterin/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (gefüllte Rhomben) und Liposomen umfassend HSPC/mPEG-DSPE/Lipid-DTB-Mitomycin C (gefüllte Kreise) verblieben sind.

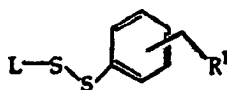
Detaillierte Beschreibung der Erfindung

I. Definitionen

[0038] Die folgenden Abkürzungen werden im weiteren verwendet: PEG, Polyethylenglykol; mPEG, Methoxy-PEG; DTB, Dithiobenzyl; DSPE, Distearoylphosphatylethanolamin; HSPC, hydriertes Sojaphosphatidylcholin; MMC, Mitomycin C.

II. Konjugatzusammensetzungen und Herstellungsverfahren

[0039] In einer Ausführung schließt die Erfindung ein Konjugat in Form von:



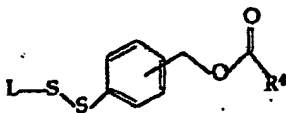
ein, wobei L eine Distearoylglycerin-Gruppe ist, die zur Einlagerung in eine liposomale Lipiddoppelschicht geeignet ist, R¹ stellt eine Mitomycin A- oder Mitomycin C-Komponente dar, die über eine Urethangruppe kovalent an die Dithiobenzylgruppe gebunden ist und wobei die Orientierung der CH₂R¹-Gruppe aus der ortho-Position oder der para-Position ausgewählt wird. Die hydrophobe Gruppe L ist ein Diacylglycerin.

[0040] In dem Konjugat ist ein therapeutischer Wirkstoff an die Dithiobenzylgruppe durch eine kovalente Verbindung verknüpft, wobei eine Wirkstoffgruppe gebildet wird, die durch R¹ in der Strukturformel dargestellt ist.

[0041] Der therapeutische Wirkstoff ist kovalent mit der Dithiobenzylgruppe durch eine Urethanbindung verknüpft.

[0042] Die Urethanbindung nimmt die Form O(C=O)NH-R⁴ oder O(C=O)N=R⁴ an, wobei R⁴ die therapeutische Wirkstoffgruppe darstellt. Deshalb reagiert Mitomycin C oder Mitomycin A, um eine Urethanbindung mit der Aminogruppe in dem Arzneimittel zu bilden.

[0043] Konjugate können allgemein durch die folgende Strukturformel dargestellt werden



wobei R⁴ eine Gruppe des therapeutischen Wirkstoffs darstellt.

[0044] [Fig. 1](#) zeigt ein Synthesereaktionsschema zur Herstellung von beispielhaften Konjugaten in Übereinstimmung mit der Erfindung. In dieser Ausführungsform wird die Synthese einer Zwischenverbindung, para-Diacylglyceroldithiobenzalkohol (Verbindung IV), zur weiteren Reaktion mit einem ausgewählten therapeutischen Wirkstoff durchgeführt. Die Verbindung IV wird, wie in Beispiel 1 beschrieben, durch Reaktion von 3-Mercapto-1,2-Propandiol (Verbindung I) mit Wasserstoffperoxid hergestellt, um rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandiol) (Verbindung II) zu bilden. Rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandiol) wird mit der hydrophoben Gruppe R acyliert.

[0045] Beispiel 1 beschreibt im einzelnen das Reaktionsverfahren, wenn R Stearinsäure ist.

[0046] Die Acylierung von Verbindung II ergibt Rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandieraroyl) (Verbindung III), was mit Sulfurylchlorid und 4-Mercaptobenzalkohol reagiert, um das gewünschte Zwischenprodukt para-Diacylglyceroldithiobenzalkohol (Verbindung IV) zu bilden.

[0047] Die Verbindung IV reagiert sofort mit einem Wirkstoff, der eine reaktive Amingruppe (R'-NH₂) enthält, um ein Lipid-DTB-Arzneimittel-Konjugat zu ergeben, wobei das Arzneimittel mit dem DTB über eine Urethanbindung verbunden ist (Verbindung VI).

[0048] Für diese Erfindung werden Arzneimittel mit einer Amingruppe (NH oder NH₂) verwendet, die für die Reaktion geeignet sind. Wie hier verwendet, bedeutet "geeignet für die Reaktion", daß das Arzneimittel eine Amingruppe hat, die mit der Dithiobenzylgruppe, in Form von zum Beispiel Dithiobenzylalkohol, reagiert.

[0049] Der Wirkstoff kann Mitomycin C sein, der eine reaktive Amingruppe (Aziridingruppe) aufweist. Der andere beispielhafte Wirkstoff ist Mitomycin A.

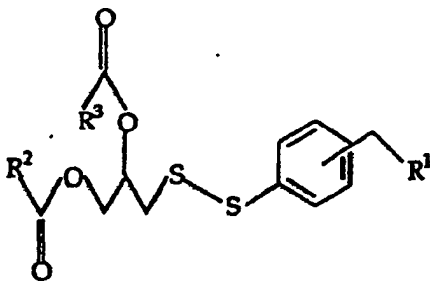
[0050] Beispiel 1 beschreibt auch ausführlich die Reaktionsbedingungen zur Herstellung von ortho-Diacylglyceroldithiobenzalkohol, das als Zwischenverbindung dient, um das Konjugat zu bilden.

[0051] [Fig. 2A](#)–[Fig. 2B](#) zeigen die Herstellung eines Lipid-DTB-Arzneimittelkonjugats ([Fig. 2A](#)) und die thio-lytische Spaltung des Konjugats in Gegenwart ein Reduktionsmittels ([Fig. 2B](#)). Wie in [Fig. 2A](#) gezeigt, reagiert die Verbindung VII aus [Fig. 1](#), bei der die hydrophobe Gruppe R von einer Fettsäure R'(CO)OH, wie zum Beispiel Stearinsäure (CH₃(CH₂)₁₆CO₂H), abgeleitet ist, mit einem aminhaltigen Wirkstoff, H₂N-Wirkstoff, in Anwesenheit von Phosgen (COCl₂). Diese Reaktion ergibt das Lipid-DTB-Wirkstoffkonjugat, das in [Fig. 2A](#) dargestellt ist. Nach Behandlung unter reduzierenden Bedingungen, d.h. mit einem Reduktionsmittel wie Cystein oder Glutathion, zerfällt das Konjugat, um die in [Fig. 2B](#) gezeigten Produkte zu ergeben. Wie gezeigt, ergibt die thio-lytische Spaltung des Konjugats die Erzeugung des Arzneimittels in einem unmodifizierten natürlichen Zustand. Dies ist eine erwünschte Eigenschaft, weil, wie unten beschrieben wird, das Arzneimittel in dem Konjugat schnell in Liposomen zur Verabreichung in vivo in einer Substanz eingebracht wird. Außerdem ist das Arzneimittel in Form eines Konjugats nicht toxisch, wie ebenfalls weiter unten beschrieben wird. Nach der Verabreichung und der Behandlung mit einem endogenen Reduktionsmittels oder Behandlung mit einem exogenen Reduktionsmittel, zerfällt das Konjugat, um den Wirkstoff in seinem nativen Zustand und mit biologischer Aktivität zu ergeben.

[0052] [Fig. 6A](#) zeigt die Synthese eines Konjugats in Übereinstimmung mit einer Ausführungsform der Erfindung. In dem gezeigten Reaktionsschema reagiert Mitomycin C (Verbindung XVII, [Fig. 6B](#)) einem Arzneimittel enthaltend eine reaktive Amingruppe, mit para-Diacylglyceroldithiobenzalkohol (Verbindung IV) in Gegenwart von Phosgen, um ein Diacyldiglyceroldithiobenzyl-Mitomycin C-Konjugat (Verbindung XVIII) zu bilden. Einzelheiten der Synthese werden in Beispiel 2 beschrieben.

[0053] [Fig. 6B](#) zeigt die thio-lytische Zersetzung eines Diacyldiglycerol-DTB-Mitomycin C-Konjugates. In Gegenwart eine Reduktionsmittels zerfällt das Konjugat, um Mitomycin C (Verbindung XVII) und die anderen gezeigten Produkte wieder zu bilden.

[0054] Wie oben erwähnt, ist die hydrophobe Gruppe in dem Konjugat ein Diacyldiglycerollipid mit der Struktur:



wobei R^2 und R^3 Kohlenwasserstoffe mit 17 Kohlenstoffatomen sind.

[0055] In zusätzlichen Untersuchungen zur Stützung der Erfindung, die unten beschrieben sind, wurde das Konjugat, das wie in [Fig. 6A](#) beschrieben, para-Diastearoyl-DTB-Mitomycin C (Verbindung XVII) hergestellt wurde, verwendet. Dieses Konjugat ist der Einfachheit halber in [Fig. 9A](#) gezeigt.

[0056] [Fig. 9B](#) zeigt ein para-Dipalmitoyl-DTB-Mitomycin C-Konjugat.

[0057] Ortho-Dipalmitoyl-DTB-Mitomycin C-Konjugat ist in [Fig. 9C](#) gezeigt.

III. Herstellung von Liposomen, die Konjugate enthalten

[0058] In einer anderen Ausführungsform schließt die Erfindung eine Liposomenzusammensetzung ein, die ein vesikelbildendes Lipid und das oben beschriebene Konjugat umfaßt. Liposomen sind geschlossene Lipid-vesikel, die für eine Vielzahl therapeutischer Zwecke und insbesondere für den Transport von therapeutischen Wirkstoffen zu Targetregionen oder -zellen durch systemische Administration von Liposomen verwendet werden. Insbesondere sind Liposomen, die eine Oberfläche, die mit hydrophilen Polymerketten beschichtet ist, wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG) aufweisen, als Wirkstoffträger erwünscht, weil diese Liposomen eine ausgedehnte Blutkreislauflebensdauer gegenüber Liposomen, denen die Polymerschicht fehlt, bieten. Das Polymer wirkt als eine Barriere gegenüber Blutproteinen, wobei die Bindung der Proteine und die Erkennung der Liposomen zur Aufnahme und Entfernung durch Makrophagen oder andere Zellen des reticuloendothelialen Systems verhindert werden.

[0059] Liposomen gemäß der Erfindung schließen ein Konjugat in Kombination mit einem Lipid, was eine Ausführungsform eines vesikelbildenden Lipids ist und wahlweise anderen Zweischichtenkomponenten ein. "Vesikelbildende Lipide" sind Lipide, die spontan Doppelschichtvesikel in Wasser bilden. Die vesikelbildenden Lipide haben vorzugsweise zwei Kohlenwasserstoffketten, bezeichnenderweise Acylketten und eine polare Kopfgruppe. Es sind eine Vielzahl synthetischer vesikelbildender Lipide und natürlich vorkommende vesikelbildende Lipide im Stand der Technik bekannt, wobei die beiden Kohlenwasserstoffketten typischerweise von etwa 12 bis 24 Kohlenstoffatomen in der Länge und verschiedene Nichtsättigungsgrade aufweisen. Beispiele schließen die Phospholipide, wie Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SM) ein. Ein bevorzugtes Lipid, das in dieser Erfindung verwendet wird, ist hydriertes Sojaphosphatidylcholin (HSPC). Eine andere bevorzugte Familie von Lipiden sind Diacylglycerole. Diese Lipide können im Handel erhalten werden oder gemäß veröffentlichter Verfahren hergestellt werden.

[0060] Das vesikelbildende Lipid kann so ausgewählt werden, um einen Grad an Fließvermögen oder Festigkeit zu erreichen, um so die Stabilität des Liposoms im Serum zu kontrollieren, und um die Freisetzungsrates eines eingeschlossenen Mittels in dem Liposom zu kontrollieren. Liposomen mit einer festeren Lipiddoppelschicht oder einer flüssigen kristallinen Doppelschicht können durch die Aufnahme eines relativ unbeweglichen Lipids, z.B. eines Lipids mit einer relativ hohen Phasenübergangstemperatur, z.B. auf bis etwa 80°C, hergestellt werden. Unbewegliche Lipide, d.h. gesättigte liefern eine größere Membranfestigkeit in der Lipiddoppelschicht. Andere Lipidkomponenten, wie Cholesterin, sind auch bekannt, um die Membranfestigkeit in Lipiddoppelschichtstrukturen zu liefern.

[0061] Lipidfließvermögen wird durch Aufnahme von relativ fluiden Lipiden, bezeichnenderweise einer Lipidphase mit einer relativ geringen flüssig zu flüssigkristallinen Phasenübergangstemperatur, z.B. bei oder unter Raumtemperatur (etwa 20 bis 25°C), erreicht.

[0062] Das Liposom kann auch andere Komponenten, die in den Lipiddoppelschichten aufgenommen sein können, wie Sterole enthalten. Diese anderen Komponenten haben typischerweise eine hydrophile Gruppe in Kontakt mit dem Inneren, eine hydrophobe Region in der Doppelschichtmembran, und eine polare Kopfgruppe, die nach Außen orientiert ist, eine polare Oberfläche der Membran.

[0063] Eine andere Lipidkomponente in den Liposomen der vorliegenden Erfindung ist ein vesikelbildendes Lipid, das mit einem hydrophilen Polymer derivatisiert ist. Bei dieser Lipidkomponente ergibt sich eine derivatisiertes Lipid aus der Bildung einer Oberflächenschicht einer hydrophilen Polymerkette auf sowohl der inneren als auch der äußeren Lipiddoppelschichtoberfläche. Bezeichnenderweise sind etwa 1–20 Molprozent des derivatisierten Lipids in der Lipidzusammensetzung aufgenommen.

[0064] Hydrophile Polymer, die für die Derivatisierung mit einem vesikelbildenden Lipid geeignet sind, schließen Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylmethylether, Polymethyloxazolin, Polyethyloxazolin, Polyhydroxypropyloxazolin, Polyhydroxypropylmethacrylamid, Polymethacrylamid, Polymethylacrylamid, Polyhydroxypropylmethacrylat, Polyhydroxyethylacrylat, Hydroxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Polyethylenglycol und Polyaspartamid ein. Die Polymere können als Homopolymere oder als Block- oder statistische Copolymere verwendet werden.

[0065] Eine bevorzugte hydrophile Polymerkette ist Polyethylenglycol (PEG), vorzugsweise eine PEG-Kette mit einem Molekulargewicht von etwa 500 bis etwa 10.000 Dalton, vorzugsweise etwa 1.000 bis etwa 5.000 Dalton. Mit methoxy- oder ethoxy-versehene Analoge des PEG werden auch als hydrophile Polymere bevorzugt. Diese Polymere sind im Handel in einer Vielzahl von Polymergrößen, z.B. von etwa 12 bis etwa 220.000 Dalton erhältlich.

[0066] Liposomen der vorliegenden Erfindung schließen bezeichnenderweise zwischen etwa 1 und etwa 30 Molprozent des Lipid-DTB-Arzneimittel-Konjugats ein, vorzugsweise etwa 5 und etwa 30 Molprozent, noch bevorzugter zwischen etwa 5 und etwa 20 Mol-%. In Untersuchungen, die zur Stützung der Erfindung durchgeführt wurden, wurden Liposome umfassend das vesikelbildende hydrierte Sojaphosphatidylcholin (HSPC), Distearoylphosphatidylethanolamin, derivatisiert mit Methoxypolyethylenglykol (mPEG-DSPE) und das in [Fig. 9A](#) gezeigte Konjugat, para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C (Verbindung XVIII), wie in den Beispielen 4A–4B beschrieben, hergestellt. Eine der Liposomenformulierungen schließt Cholesterin (Beispiel 4A) mit den Lipiden HSPC/Cholesterin/m-PEG-DSPE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C (Verbindung XVIII) ein, die mit einem Molekulargewicht 60/30/5/5 vorhanden sind. Eine zweite Formulierung, die kein Cholesterin enthielt, wurde hergestellt und charakterisiert (Beispiel 4B). In dieser Formulierung waren die Lipide HSPC/m-PEG-DSPE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C (Verbindung XVII) in einem molaren Verhältnis von 90/5/5 vorhanden.

IV. In vitro-Charakterisierung von Liposomen, die ein Konjugat enthalten

A. In vitro-Arzneimittelfreisetzung

[0067] Liposomen wurden, wie in den Beispielen 4A–4B beschrieben, hergestellt und in vitro charakterisiert, um die Freisetzungsrates von Mitomycin C nach der Behandlung mit einem Reduktionsmittel zu bestimmen. Für die in vitro-Untersuchungen wurden die Reduktionsbedingungen durch die Zugabe von Cystein bezeichnenderweise in einer Konzentration von etwa 150 µM zu dem Testmedium induziert. Es ist anzunehmen, daß in vivo, endogene Reduktionsbedingungen ausreichend sein können, um thiolytische Zersetzung des Lipid-DTB-Arzneimittel-Konjugats zur Freisetzung des Wirkstoffs zu bewirken. Es wird außerdem erwartet, daß Reduktionsbedingungen in vivo künstlich durch die Administration geeigneter Reduktionsmittel, wie Cystein oder Glutathion, induziert werden können.

[0068] Die Liposomenformulierungen, z.B. HSPC/Cholesterin/m-PEG-DSPE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C Verbindung XVIII (im weiteren die "cholesterinhaltige Verbindung") und HSPC/m-PEG-DSPE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C Verbindung XVII (im weiteren die "cholesterinfreie Liposomverbindung") wurden bei 37°C in Gegenwart von 150 µM Cystein über 24 Stunden inkubiert. Es wurden zu ausgewählten Zeitpunkten Proben genommen und mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert, um die Menge an Konjugat und freiem Mitomycin C zu bestimmen. Die HPLC-Bedingungen sind in Beispiel 5 beschrieben.

[0069] Die [Fig. 10A–Fig. 10B](#) zeigen die HPLC-Chromatogramme für zwei Liposomenformulierungen. In [Fig. 10A](#) sind die Ergebnisse der cholesterinfreien Liposomenformulierung gezeigt. Zum Zeitpunkt Null ist kein nachweisbares freies Mitomycin C vorhanden und aller meßbarer Wirkstoff in Form von einem Lipid-DTB-Arzneimittel-Konjugat ist im Liposom gebunden. Wenn die Inkubationszeit ansteigt, nimmt die Menge an Mitomy-

cin C zu, das aus dem Liposom freigesetzt wird und in freier Form nachweisbar ist, mit einer entsprechenden Abnahme der Anwesenheit von konjugatgebundenem Mitomycin C.

[0070] [Fig. 10B](#) zeigt die Ergebnisse der Liposomformulierung, die Cholesterin enthält. In der ersten bei einem Zeitpunkt Null genommenen Probe, ist kein freies Mitomycin C nachweisbar. Nach einer Stunde Inkubation in 150 μM Cystein wurde eine kleine Menge Arzneimittel nachgewiesen, dies zeigt die Zersetzung des liposomgebundenen Lipid-DTB-Mitomycin-Konjugates an. Im Vergleich mit [Fig. 10A](#) zeigen die Liposomen, die Cholesterin enthalten eine langsamere Konjugatzersetzung und demgemäß eine langsamere Arzneimittelfreisetzung.

[0071] [Fig. 11](#) ist eine Diagramm, das die Prozent an Mitomycin C zeigt, die aus den zwei Liposomenformulierungen freigesetzt wurden, wie aus den Chromatogrammen in den [Fig. 10A–Fig. 10B](#) bestimmt wurde. Die cholesterinfreien Liposomen (gefüllte Rhomben) hatten eine höhere Freisetzungsrates als die Liposomen, die Cholesterin enthielten (gefüllte Kreise). Mehr als 50% des Mitomycin C wurden aus dem liposomgebundenen Konjugat nach 2 Stunden aus der cholesterinfreien Formulierung freigesetzt. Bei beiden Formulierungen waren mehr als 80% Arzneimittel nach 24 Stunden am Ende der Inkubationsperiode freigesetzt.

[0072] In einer anderen Untersuchung wurden die zwei Liposomenformulierungen mit 1,5 mM Cystein inkubiert. Die durchgeführte Analyse ist in Beispiel 5 beschrieben und die Ergebnisse sind in den [Fig. 12A–Fig. 12B](#) gezeigt. [Fig. 12A](#) zeigt die Prozent Mitomycin C, die aus dem Lipid-DTB-Arzneimittel-Konjugat aufgenommen in dem cholesterinfreien Liposom HSPC/m-PEG-DSPE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C, freigesetzt wurden. Die prozentuale Freisetzung während der Inkubation mit 150 μM sind zum Vergleich auch gezeigt (gefüllte Rhomben). Es ist ersichtlich, daß die Inkubation mit einer höheren Konzentration an Reduktionsmittel (1,5 mM, leere Rhomben) einen Anstieg in der Zersetzungsrates des Konjugats und der Rate der Wirkstofffreisetzung bewirkt.

[0073] [Fig. 12B](#) zeigt die Ergebnisse für die Liposomenformulierung, die Cholesterin enthält. Liposomen, die mit 1,5 mM (leere Kreise) inkubiert waren, zeigten eine signifikant höhere Zersetzungsrates als die gleichen Liposomen, die mit 150 μM Cystein (gefüllte Kreise) inkubiert waren.

B. In vitro-Cytotoxizität

[0074] Die in vitro-Cytotoxizität von Liposomen, die Lipid-DTB-Mitomycin C-Konjugate (Verbindung XVIII) enthalten, wurde mit M109-Zellen einer Mauslungenkarzinomzelllinie bestimmt. Wie in Beispiel 6 beschrieben, wurden M109-Zellen in Gegenwart von freiem Mitomycin C oder Liposomen, die Distearoyl-DTB-Mitomycin C-Konjugate enthalten, inkubiert. Liposomen, die, wie in den Beispielen 4A–4B beschrieben mit molaren Verhältnissen, wie in Beispiel 6 genannt, hergestellt wurden, wurden getestet. Cystein in Konzentrationen von 150 μM , 500 μM und 1000 μM wurde zu einigen Testzellen gegeben, um die thiolytische Zersetzung des Konjugats und die Freisetzung von Mitomycin C zu bewirken.

[0075] IC_{50} -Werte wurden als die Arzneimittelkonzentration genommen, bei der 50% Inhibition der Kontrollwachstumsrate (IC_{50}), wie in Beispiel 6 beschrieben, bewirkt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

IC_{50} -Werte für M109-Tumorzellen nach 72 Stunden kontinuierlicher Behandlung mit der Formulierung

Formulierung	Cysteinkonzentration			
	0	150 μM	500 μM	1000 μM
freie MMC ¹	285 \pm 92	n.d. ⁴	n.d.	300 \pm 71
Liposomen mit Cholesterin ²	1750 \pm 356	1140 \pm 368	650 \pm 42	510 \pm 113
cholesterinfreie Liposomen ³	5400 \pm 1414	4550 \pm 1484	3600 \pm 1272	2550 \pm 778

¹ MMC = Mitomycin C

² HSPC/Cholesterin/m-PEG-DSPE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C

³ HSPC/m-PEG-DSPE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C

⁴ n.d. = nicht durchgeführt

[0076] Die prozentuale Wachstumsrate von M109 Mauskarzinomzellen, die mit den Cytotoxizitätsuntersuchungen bestimmt wurden, sind in [Fig. 13](#) gezeigt. Die prozentuale Wachstumsrate ist ausgedrückt als die Prozentzahl basierend auf der Wachstumsrate von M109-Zellen in Abwesenheit von Mitomycin C und von Cystein und ist als Funktion der Mitomycin C-Konzentration in nM gezeigt. Die Wachstumsrate der Zellen wurde, wie in Beispiel 6 beschrieben, bestimmt. Es zeigt sich, daß die prozentuale Wachstumsrate abnimmt, wenn die Cysteinkonzentration zunimmt sowohl für Liposomen, die Cholesterin enthalten (leere Kreise) und die cholesterinfreien Liposomformulierung (gefüllte Quadrate). Es kann auch gesehen werden, daß Cystein keine Wirkung auf die Aktivität von freiem Mitomycin C hat, und daß Mitomycin C aus dem Konjugat freigesetzt wird, um wirksam das Zellwachstum zu inhibieren.

[0077] Die in vitro-Wachstumsrate von M109 Mauskarzinomzellen, die mit Mitomycin C in seiner freien Form oder mit Mitomycin C in der Form eines liposomgebundenen Lipid-DTB-Arzneimittel-Konjugats behandelt wurden, ist in den [Fig. 14A–Fig. 14b](#) gezeigt. In [Fig. 14A](#) sind die Ergebnisse für die Liposomenformulierung, die kein Cholesterin enthält, gezeigt. In dem Diagramm ist die Wachstumsrate von M109 Zellen ausgedrückt als prozentualer Anteil basierend auf dem Wachstum von M109 Zellen in Abwesenheit von Arzneimittel und Cystein und ist als eine Funktion der Mitomycin C Konzentration in nM gezeigt. Die Zellen, die mit Mitomycin in seiner freien Form (leere Dreiecke) und Mitomycin C in freier Form plus 1000 µM Cystein (gefüllte Dreiecke) behandelt wurden, zeigen eine Abnahme in der Wachstumsrate infolge der Toxizität des Arzneimittels in seiner freien Form. Zellen, die mit der Liposomformulierung umfassend HSPC/m-PEG-DSPE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C (leere Kreise) und mit der Liposomformulierung mit zusätzlichem Cystein, zugefügt in Konzentrationen von 150 µM (leere Rhomben), 500 µM (leere Kreise) und 1000 µM (leere Quadrate) behandelt wurden, zeigten eine Zellcytotoxizität in einer cysteindosisabhängigen Weise.

[0078] [Fig. 14B](#) ist ein ähnliches Diagramm für die Liposomformulierung, die Cholesterin enthält. Das gleiche Muster wurde für Zellen erhalten, die mit der Liposomenzusammensetzung mit Cholesterin plus zusätzlichem Cystein in Konzentrationen von 150 µM (leere Rhomben), 500 µM (leere Kreise) und 1000 µM (leere Quadrate). Das heißt, wenn die Konzentration von Cystein zunimmt, nimmt das Zellwachstum ab. Dies deutet eine cysteininduzierte Freisetzung von Mitomycin C in direkter Wechselwirkung mit der Cysteinkonzentration an. Im Gegensatz zu den Liposomenformulierungen war die in vitro-Wachstumsrate der Zellen, die mit Mitomycin C in seiner freien Form (leere Dreiecke) behandelt wurden, die gleichen wie die Wachstumsrate von Zellen, die mit Mitomycin C in freier Form plus 1000 µM Cystein (gefüllte Dreiecke) behandelt wurden.

[0079] [Fig. 15](#) zeigt den prozentualen Anstieg der Cytotoxizität als eine Funktion der Cysteinkonzentration in µM, von freiem Mitomycin C und der Liposomenformulierungen. Der Anstieg der Cytotoxizität wurden durch den prozentualen Abfall IC_{50} , z.B. IC_{50} in Anwesenheit von Cystein bezogen auf IC_{50} in Abwesenheit von Cystein mal 100 ($(IC_{50\text{Cystein}}/IC_{50\text{Cystein}}) \times 100$). Wie gesehen steigt sowohl für die Liposomen, die Cholesterin enthalten (leere Dreiecke), als auch für die cholesterinfreien Liposomen (gefüllte Kreise), die prozentuale Cytotoxizität signifikant an, wenn die Cysteinkonzentration ansteigt. Die Cytotoxizität von freiem Mitomycin C (gefüllte Quadrate) wird nicht durch die Gegenwart von Cystein beeinflusst.

[0080] Die Cytotoxizitätsdaten zeigen, daß die cholesterinfreie Liposomformulierung durch Cystein mehr beeinflusst wird. Der IC_{50} der cholesterinfreien Liposomformulierung bei bestimmten Cysteinkonzentrationen ist nur 2mal niedriger als mit dem freien Arzneimittel allein. Die Liposomformulierung mit Cholesterin ist weniger cytotoxisch als die cholesterinfreie Liposomformulierung. Die Daten zeigen auch, daß Cystein keinen cytotoxischen Effekt auf Tumorzellen, und keine Wirkung auf die Cytotoxizität des freien Mitomycin C hat. Es ist auch aus den Daten ersichtlich, daß Cystein in einer dosisabhängigen Weise die Cytotoxizität von liposomgebundenem Mitomycin C erhöht. Deshalb sind die cytotoxischen Effekte, die für die liposomalen Formulierungen beobachtet wurden, für die cysteinvermittelte Freisetzung von Mitomycin C aus dem Lipid-DTB-Arzneimittel-Konjugat im wesentlichen geklärt.

C. In vivo-Pharmakokinetiken

[0081] Die in vivo-Pharmakokinetiken von Liposomen mit Cholesterin und cholesterinfreien Liposomenverbindungen wurden in Ratten bestimmt. Wie in Beispiel 7 beschrieben, wurden die Tiere mit einer einzelnen intravenösen Bolusinjektion von ungefähr 0,1 mg/ml Mitomycin C in freier Form oder in Liposomen in Form des Lipid-DTB-Mitomycin C-Konjugats enthalten in Übereinstimmung mit der Erfindung behandelt. Nach der Injektion wurden Blutproben genommen und hinsichtlich der Menge Mitomycin C analysiert. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 16A–Fig. 16B](#) gezeigt.

[0082] [Fig. 16A](#) zeigt die Konzentration (µg/ml) Mitomycin C im Rattenblut als Funktion der Zeit in Stunden

nach der intravenösen Injektion. Es ist ersichtlich, daß freies Mitomycin C (leere Quadrate), das intravenös verabreicht wurde, ist schnell aus dem Blut geklärt ist. Mitomycin C in Form eines liposomgebundenen Lipid-DTB-Mitomycin C-Konjugats bleibt im Blutkreislauf für eine wesentlich längere Zeit. Mitomycin C assoziiert mit Liposomen mit Cholesterin (gefüllte Rhomben) und mit cholesterinfreien Liposomen (gefüllte Kreise) wurde im Blut mit mehr als 10 µg/ml für 20 bis 25 Stunden nachgewiesen.

[0083] [Fig. 16B](#) zeigt die Prozent der injizierten Dosis als eine Funktion der Zeit in Stunden nach intravenöser Injektion der Testformulierung, die im Blut verbleibt. Praktisch keine der Dosen von freiem Mitomycin C (leere Quadrate) bleibt im Blut zu Zeitpunkten von mehr als 5 Minuten. Jedoch nach 20 Stunden nach der Injektion der Liposomenformulierungen verbleiben 15 bis 18 Prozent der Dosis im Kreislauf. Dies zeigt, daß das Mitomycin C-DTB-Lipid-Konjugat in dem Liposom während der Zirkulation stabil bleibt, und daß minimale thiolitische Zersetzung im Plasma vorkommt. Deshalb, scheint dieses System mit dem langzirkulierenden Liposomen (Stealth®-Liposomen) kompatibel ist, die eine verlängerte Blutzirkulationslebensdauer aufweisen und in Tumoren verstärkt akkumuliert werden.

V. Beispiele

[0084] Die folgenden Beispiele beschreiben des weiteren die hier offenbarte Erfindung.

Materialien

[0085] Alle Materialien sind handelsüblich von bekannten Verkäufern, wie Aldrich Corporation, erhältlich.

Beispiel 1

Synthese von para-Diacyldiglycerolthiobenzalkohol (Verbindung IV) und ortho-Diacyldiglycerolthiobenzalkohol

A. para-Diacyldiglycerolthiobenzalkohol

[0086] Diese Reaktion ist in [Fig. 1](#) veranschaulicht. Es wurde das Verfahren von Snyder, W. R. (Journal of Lipid Research, 28: 949, (1987) angewendet, um die Verbindungen II und III herzustellen.

[0087] Ein 100 ml Rundhalskolben mit 3-Mercapto-1,2-propandiol (Verbindung I, 1 g, 9,26 mMol) in 5 ml Wasser wurde in ein Eisbad gegeben. Zu diesem Kolben, dessen Inhalt schnell gerührt wird, wurde tropfenweise Wasserstoffperoxid (genau 0,5 Mol entsprechend 525 µl, 4,63 mMol) zugefügt, während die Temperatur zwischen 30–40°C gehalten wurde. Am Ende dieses exothermen Verfahrens wurde die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Wasser wurde mit einem Rotationsverdampfer durch sukzessive Zugabe von Acetonitril in 20 ml Aliquots in ein Azeotrop überführt. Das Verfahren der Acetonitrilzugabe wurde 3 bis 4 mal wiederholt, bis alles Wasser entfernt war, es wurde ein gelbes Öl erhalten. Nach dem Auskratzen des Kolbens mit einem Metallspatel und Kühlen über Nacht bei –20°C wurde das ölige Produkt verfestigt (Verbindung II, rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandiol)). Der kreideartige Feststoff wurde im Vakuum über P₂O₅ getrocknet. Ausbeute: 630 mg, 63%. ¹H-NMR (CD₃OD, 360 MHz) δ 2,77, 2,95 (2 × d, CH₂OH, 2H), 3,59 (m, SCH₂, 2H), 3,87 m, CH, 1H) ppm.

[0088] Das rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandiol)-Produkt (Verbindung II) wurde durch Zugabe der Verbindung (980 mg, 4,6 mMol) in einen im Ofen getrockneten 100 ml Rundhalskolben acyliert und in trockenem Methanchlorid (40 ml) gelöst. Dazu wurden Stearinsäure (4,92 g, 17,1 mMol) und 4-(Dimethylamino)pyridinium-4-toluolsulfonat (1,38 g, 4,6 mMol) als Katalysator gegeben und bei Raumtemperatur (25°C) für 20 Minuten gerührt. Dann wurde Diisopropylcarbodiimid (3,1 ml, 20 mMol) hinzupipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur die Reaktion durchgeführt. TLC Silic auf GF (10% Ethylacetat in Hexan) zeigte die vollständige Reaktion der Diolgruppe. rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandiol) R_f = 0,60; rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandistearoyl) R_f = 0,35. Amberlyst® A-21 ein leicht basisches Ionenaustauschharz (~3 g) und Amberlyst® A-15 ein stark saures Ionenaustauschharz (~3 g) wurden zu der Reaktionsmischung gegeben. Nach 30 Minuten Rühren wurden die Harze abfiltriert und das Filtrat wurde getrocknet. Der Rückstand wurde aus Isopropanol dreimal rekristallisiert (jeweils 100 ml). Das feste Produkt rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandistearoyl) (Verbindung III) wurde gesammelt und über P₂O₅ getrocknet. Schmelzpunkt 54–55°C. ¹H-NMR (CDCl₃, 360 MHz) δ 0,86 (t, CH₃, 6H), 1,22 (s, Lipid, 56 H), 1,48 (m, CH₂CH₂(CO)O, 4H), 2,26 (2 × t, CH₂(CO)O, 4H), 2,87 (d, CH₂S, 2H); 4,03 & 4,22 (2 × d, CH₂CH des Lipids, 2H), 4,97(m, CHCH₂ des Lipids) ppm.

[0089] Im nächsten Schritt wurde eine Lösung rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandistearoyl) (Verbindung III) (2,97

g, 2,33 mMol) in Toluol (30 ml) gelöst und in ein Eisbad gegeben. Sulfurylchlorid (1,9 ml, 23,2 mMol) wurde in den Kolben pipettiert und die Mischung wurde bei Eisbadtemperatur für 30 Minuten gerührt. Der Kolben wurde dann in Raumtemperatur gestellt und für weitere 30 Minuten gerührt. Der Überschuss an Sulfurylchlorid wurde mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Ein frisches Aliquot (20 ml) Toluol wurde in den Reaktionskolben gegeben und in ein Eisbad gestellt. Dazu wurde langsam eine Lösung 4-Mercaptobenzalkohol (780 mg, 5,6 mMol) in Toluol gegeben. Nach 5 Stunden Reaktionszeit wurde das gesamte Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer bis zur Trockne entfernt. Warmes Ethylacetat (10 ml) wurde in den Reaktionskolben gegeben, um den Feststoff zu lösen und das unlösliche Material wurde abfiltriert. Zu der Ethylactatlösung wurde 50 ml Ether zum Ausfällen gegeben und das feste Produkt (para-Diaryl-diglycerol-dithiobenzalkohol, Verbindung IV) wurde durch Filtration aufgefangen. Dieses Verfahren wurde zweimal wiederholt. Ausbeute: 75%.

[0090] Um das Produkt (para-Diaryl-diglycerol-dithiobenzalkohol, Verbindung IV) zu reinigen, wurde eine Silicagelsäule (20 × 2,5 cm) in Chloroform hergestellt. Die Probe wurde in einer minimalen Menge Chloroform gelöst und durch Zugabe von zwei verschiedenen mobilen Phasen chromatographiert. Erstens wurden 100% CHCl_3 eluiert. Diese Fraktion enthielt die Verunreinigung Dithiobenzylalkohol. Dies wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ bestätigt. Dann wurde die mobile Phase in 15% Methanol in Chloroform geändert, das reine Produkt wurde durch Flashchromatographie aufgefangen. Mit Elution von 500 ml $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (15:85) wurde reines DGTBA (ein Punkt mit TLC) aufgefangen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Feststoff aus t-BuOH lyophilisiert und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Die letzte Reinigung drückt die Ausbeute auf 40%, 1,4 g. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 360 MHz) δ 0,86 (t, CH_3 , 6H), 1,22 (s, Lipid, 56 H), 1,48 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO})\text{O}$, 4H), 2,26 (2 × t, $\text{CH}_2(\text{CO})\text{O}$, 4H), 2,87 (d, CH_2S , 2H); 4,03 & 4,22 (2 × d, CH_2CH des Lipids, 2H), 4,96 (s, CH_2 , bz, 2H), 4,97 (m, CHCH_2 des Lipids), 7,36 & 7,56 (d, CH_2 , aromatisch, 4H) ppm.

5 mg der Probe wurde für eine Elementaranalyse an ein Labor geschickt (Midwest Micro Lab).

Analyse	Theoretisch	Gemessen
Kohlenstoff	70,93%	70,67%
Wasserstoff	10,50%	10,41%
Schwefel	8,25%	8,31%

B. ortho-Dialyldithiobenzalkohol

[0091] Eine Lösung rac-3,3'-Dithiobis(1,2-propandistearoyl) (Verbindung III) (200 mg, 0,156 mMol) wurde in Toluol (30 ml) gelöst und in ein Eisbad gegeben. Sulfurylchlorid (39 μl , 0,47 mMol) wurde in den Kolben pipettiert und die Mischung wurde bei Eisbadtemperatur für 30 Minuten gerührt. Der Kolben wurde dann bei Raumtemperatur belassen und für weitere 30 Minuten gerührt. Der Überschuss an Sulfurylchlorid wurde mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Ein frisches Aliquot (20 ml) Toluol wurde in den Reaktionskolben gegeben und in ein Eisbad gestellt. Dazu wurde langsam eine Lösung 4-Mercaptobenzalkohol (48 mg, 35 mMol) in Toluol gegeben. Nach 5 Stunden Reaktionszeit wurde das gesamte Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer bis zur Trockne entfernt. Warmes Ethylacetat (10 ml) wurde in den Reaktionskolben gegeben, um den Feststoff zu lösen und das unlösliche Material wurde abfiltriert. Zu der Ethylactatlösung wurden 50 ml Ether zum Ausfällen gegeben und das feste Produkt (ortho-Diaryl-diglycerol-dithiobenzalkohol) wurde durch Filtration aufgefangen. Dieses Verfahren wurde zweimal wiederholt. Der Feststoff wurde im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Ausbeute: 75%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 360 MHz) δ 0,86 (t, CH_3 , 6H), 1,25 (s, Lipid, 56 H), 1,58 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO})\text{O}$, 4H), 2,28 (2 × t, $\text{CH}_2(\text{CO})\text{O}$, 4H), 2,91 (d, CH_2S , 2H); 4,14 & 4,35 (2 × d, CH_2CH des Lipids, 2H), 4,86 (s, CH_2 , bz, 2H), 5,26 (m, CHCH_2 des Lipids), 7,31 (m, aromatisch, 2H), 7,48 & 7,75 (d, CH_2 , aromatisch, 4H) ppm.

Beispiel 2

Synthese von para-Diaryl-diglycerol-dithiobenzalkohol-Mitomycin C (Verbindung XVIII)

[0092] Diese Reaktion ist in [Fig. 6A](#) dargestellt.

[0093] Ein 50 ml Rundhalskolben wurde mit Phosgen (3,1 mMol) und Toluol (5 ml) ausgestattet und die Lösung wurde auf 0°C gekühlt. Eine Lösung para-Diaryl-diglycerol-dithiobenzalkohol (Verbindung IV, hergestellt wie in Beispiel 1 beschrieben, 0,31 mMol) in Toluol (2,5 ml) hergestellt. Die alkoholische Lösung wurde dann tropfenweise zu der Phosgenlösung gegeben. Die Mischung wurde über Nacht auf Raumtemperatur gebracht. Nach 18 Stunden wurde die Lösung im Vakuum konzentriert, um überschüssiges Phosgen zu entfernen. Das Acylchloridprodukt wurde in Toluol (5 ml) wieder gelöst.

[0094] Eine Lösung aus Mitomycin C (0,31 mMol), Dimethylaminopyridin (0,031 mMol) und DMF (1 ml) wurde hergestellt. Die Mitomycin C Lösung wurde tropfenweise zur der Acylchloridlösung gegeben. Nach einer Stunde wurde das Toluol verdampft und das Rohprodukt chromatographiert (1:1, Hexan:Ethylacetat) auf Silica. Das reine Produkt wurde in t-BuOH (50 ml) aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt war ein violetter Feststoff (183 mg, 53%). $R_f = 0,38$ (50% Hexan:Ethylacetat); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 360 MHz) δ 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 6H), 1,26 (s, 58 H), 1,58–1,63 (m, 4H), 1,76 (s, 3H), 2,29 (t, J = 7,6 Hz, 4H), 2,93–2,96 (m, 2H); 3,19 (s, 3H), 3,29 (dd, J = 4,7 und 2,9 Hz, 1H), 3,41 (dd, J = 5,0 und 2,2 Hz, 1H), 3,48 (dd, J = 13,7 und 2,5 Hz, 1H), 3,67 (dd, J = 11,5 und 4,7 Hz, 1H), 4,27–4,36 (m, 2), 4,43 (d, J = 13,3 Hz, 1H), 4,61 (s, 2H), 4,90 (ddd, J = 10,4 und 5,0 und 2,2 Hz, 1H), 5,00–5,12 (m, 3H), 5,26–5,30 (m, 1H), 7,32 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,50 (d, J = 7,9 Hz, 2H); MADI MS kalk. für $\text{C}_{62}\text{H}_{99}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{S}_2\text{Na}$: 1164, gefunden m/z 1164 (M + Na).

Beispiel 4

Liposomenherstellung

A. Liposom mit Cholesterin

1. Liposomenherstellung

[0095] 59 mg HSPC, 14,4 mg Cholesterin, 17,4 mg PEG-DSPE und 7,4 mg para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C (molares Verhältnis 60/30/5/5) wurden zu 1 ml trockenem Ethanol bei 60–65°C gegeben und bis zur Lösung gemischt, ungefähr 10 Minuten.

[0096] Ein Hydratisierungsmedium bestehend aus 10 mM Histidin und 150 mM NaCl in destilliertem Wasser wurde auf 70°C erwärmt.

[0097] Die warme Lipidlösung wurde schnell zu dem warmen (63–67°C) Hydratisierungsmedium unter Vermengen gegeben, um eine Suspension von Liposomen mit heterogener Größe zu bilden. Die Suspension wurde für eine Stunde bei 63–67°C vermischt.

2. Extrusion

[0098] Die Liposomen wurden nach Größe geordnet, um den gewünschten mittleren Partikeldurchmesser durch kontrollierte Extrusion durch eine Polycarbonatfilter, der in einem teflonbeschichteten rostfreiem Stahlkessel angeordnet ist, zu erhalten. Die Liposomensuspension wurde bei 63–65°C während des Extrusionsverfahrens einer Dauer von 6–8 Stunden gehalten.

3. Diafiltration

[0099] Ethanol wurde mit Diafiltration aus der Liposomensuspension entfernt. Eine Histidin/Natriumchlorid-Lösung wurde durch Lösen von Histidin (10 mM) und Natriumchlorid (150 mM) in sterilem Wasser hergestellt. Der pH der Lösung wurde auf ungefähr 7 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen 0,22 μm Duraporefilter filtriert. Die Liposomensuspension wurde in einem ungefähren 1:1 (v/v)-Verhältnis mit der Histidin/Natriumchlorid-Lösung gelöst und durch einen Polysulfonhohlfaserultrafilter filtriert. Acht Volumenaustausche wurden gegen die Histidin/Natriumchlorid-Lösung durchgeführt, um Ethanol zu entfernen. Die Verfahrensfließtemperatur wurde bei etwa 20–30°C gehalten. Die gesamte Diafiltrationszeit betrug ungefähr 4,5 Stunden.

4. Sterilfiltration

[0100] Die Liposomensuspension wurde auf 33–38°C erwärmt und durch einen 0,2 μm Gelman Supor Polyethersulfonfilter filtriert. Die gesamte Filtrationszeit betrug ungefähr 10 Minuten.

[0101] Nach jedem Verfahrensschritt (Hydrisierung, Extrusion, Dialyse und Filtration) wurde die Lipidkonzentration und Konjugat/Arzneimittelkonzentration mittels HPLC bestimmt. Die Partikelgröße der Liposomen wurde durch dynamische Lichtstreuung gemessen und die Menge an "freiem", ungebundenem Mitomycin C in dem äußeren Suspensionsmedium wurde mit HPLC bestimmt.

	Lipid-DTB-MMC ^{1,2} Konjugat ($\mu\text{g/ml}$)	Lipid (mg/ml)	Konjugat/Lipid- verhältnis	Liposomen größe (nm)		freies MMC ² (%)
				90°	30°	
Nachhydrierung	699	12,50	56	--	--	2
Nachextrusion	369	8,49	43	105	186	4
Nachdialyse	311	7,78	43	--	--	0
Nachfiltration	315	7,22	44	103	120	0

¹ Konjugat = Verbindung XVII, para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C

² MMC = Mitomycin C

B. Cholesterinfreie Liposomformulierung

[0102] Liposomen wurden, wie oben beschrieben, mit einer Lipidzusammensetzung aus HSPC, mPEG-DS-PE und para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C in einem molaren Verhältnis von 90/5/5 hergestellt. Insbesondere wurden 88,5 mg HSPC, 17,9 mg mPEG-DSPE (PEG MW 2000 Dalton) und 7,3 mg des Konjugats in 1 ml Ethanol gelöst. Liposomengröße, Lipid und Arzneimittelkonzentration und freie Mitomycin C Konzentration in dem äußeren Suspensionsmedium wurden nach jedem Verfahrensschritt gemessen.

	Lipid-DTB-MMC ^{1,2} Konjugat ($\mu\text{g/ml}$)	Lipid (mg/ml)	Konjugat/Lipid- verhältnis	Liposomen größe (nm)		freies MMC ² (%)
				90°	30°	
Nachhydrierung	525	10,94	48	--	--	3
Nachextrusion	466	9,95	47	85	110	6
Nachdialyse	404	8,35	48	--	--	0
Nachfiltration	378	7,92	48	82	93	0

¹ Konjugat = Verbindung XVII, para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C

² MMC = Mitomycin C

Beispiel 5

HPLC-Bedingungen für die in vitro-Charakterisierung

[0103] Liposomen, die wie in den Beispielen 4A–4B hergestellt wurden, wurden in 0,6 M Octylglucopyranosid gelöst. Die Liposomen wurden in Gegenwart von 150 mM Cystein bei 37°C inkubiert. Proben wurden bei einem Zeitpunkt Null, 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden genommen. Ein Volumen von 20 μl wurde mit HPLC mit einer Water Symmetry C8 3,5 \times 5 cm Säule analysiert. Die Flußrate betrug 1 ml/Min und der mobile Phasengradient war, wie folgt:

Start	10% MeOH	90% 10 mM NaPO ₄ , pH 7
5 Min.	25% MeOH	75% 10 mM NaPO ₄ , pH 7
10 Min.	25% MeOH	75% 10 mM NaPO ₄ , pH 7
15 Min.	100% MeOH	--
25 Min.	100% MeOH	--
30 Min.	10% MeOH	90% 10 mM NaPO ₄ , pH 7
35 Min.	10% MeOH	90% 10 mM NaPO ₄ , pH 7

Beispiel 6

Cytotoxizitätsuntersuchungen

A. Liposomenherstellung

[0104] Liposomen, die wie in den Beispielen 4A–4B hergestellt wurden, bestanden aus HSPC/m-PEG-DS-PE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C(90/5/5) oder HSPC/Cholesterin/m-PEG-DSPE/para-Distearoyl-DTB-Mitomycin C (90/45/5/5). Die Liposomenpräparate wurden durch eine 0,45 μm Cellulosemembran sterilfiltriert und nicht mit Extrusion eluiert. Nach der Liposomenbildung wurde die Mitomycin C-Konzentration durch Absorption bei 360 nm in Liposomen gelöst durch 10–20fache Verdünnung in Isopropanol bestimmt und die Phospholipidkonzentration wurde durch einen anorganischen Phosphatassay bestimmt.

[0105] Die Liposomen mit Cholesterin hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 275 ± 90 nm. Die cholesterinfreien Liposomen hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 150 ± 50 nm. Die Phospholipidkonzentration betrug in beiden Liposomformulierungen $10 \mu\text{M}/\text{ml}$ und die Konzentration von Mitomycin C betrug in beiden Formulierungen $120 \mu\text{g}/\text{ml}$.

B. Chemosensitivitätsassay und Bestimmung der Wachstumsrate

[0106] Der cytotoxische Effekt von freiem Mitomycin C oder Mitomycin C in der Form eines Distearoyl-DTB-Mitomycin C-Konjugats, das in Liposomen eingeschlossen ist, wurde kolorimetrisch durch einen bekannten beschriebenen Methylenblau-Färbeassay (Horowitz, A. T. et al., Biochem. Biophys. Acta, 1109, 203–209 (1992)) mit leichten Änderungen bestimmt. Nach Beendigung des Assays wurden die Zellen fixiert und mit dem Methylenblau-Färbeassay bestimmt.

[0107] In diesem Assay wurden 1500 M109 Zellen aus einer exponential wachsenden Kultur in $200 \mu\text{l}$ Aliquots (RPMI-1640-Medium + fötales Rinderserum) in eine Mikrotiterplatte mit 96 flachbödigen Wells gegeben. Nach 20 Stunden in Kultur während die Zellen anhafteten und das Wachstum fortsetzten, wurden $20 \mu\text{l}$ der Testformulierung (freies Mitomycin C oder Liposomenformulierungen) in jedes Well gegeben. Bei jedem wurde ein 10facher Anstieg in der Arzneimittelkonzentration gemessen, es wurden vier Arzneimittelkonzentrationspunkte gemessen. Jeder Test wurde mit dreifacher Ausfertigung in den Wells und mit zwei parallelen Platten durchgeführt. Die Zellen wurden kontinuierlich für 72 Stunden behandelt.

[0108] Nach der 72-stündigen Behandlungsdauer wurden die Kulturen durch Zugabe von $50 \mu\text{l}$ 2,5%igem Glutaraldehyd in jedes Well für 10 Minuten fixiert. Die Platten wurden dreimal mit deionisiertem Wasser, einmal mit $0,1 \text{ M}$ Boratpuffer (pH 8,5) bei Raumtemperatur ($20\text{--}25^\circ\text{C}$) gewaschen. Die Platten wurden mit fünf Bädern deionisiertem Wasser gespült, um nicht zellgebundenen Farbstoff zu entfernen und dann getrocknet. Der Farbstoff wurde mit $200 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ N}$ HCl für 60 Minuten bei 37°C extrahiert und die optische Dichte wurde mit einem Mikroplattenspektrometer bestimmt.

[0109] Die Zellzahl, die durch Zählen der Zellen mit einem Hemocytometer bestimmt wurden, waren in guter Übereinstimmung mit der spektrometrischen Absorption. Die anfängliche Zellaufgabendichte wurde so gewählt, um eine lineare Beziehung zwischen der Zellzahl und der Absorption am Ende der Untersuchung sicherzustellen. In jeder Untersuchung wurden sechs Wells vor der Zugabe des Arzneimittels fixiert, um die anfängliche Absorption zu bestimmen. Dieser Wert wurde verwendet, um die Wachstumsrate (GR) und die Verdopplungszeit (DT) der Kontrolle und arzneimittelbehandelten Zellen unter Verwendung der nachfolgenden Formel zu bestimmen: $DT = \ln 2 / \ln[(OD_t / OD_c) / h]$; wobei DT = Verdopplungszeit in Stunden; OD_t = Optische Dichte des Testwells am Ende der Untersuchung; OD_c = Optische Dichte des Kontrollwells am Anfang der Untersuchung; h = Dauer der Inkubation in Stunden.

[0110] Die Wachstumsrate wurde mit $GR = (\ln 2 / DT)$ berechnet. Die prozentuale Wachstumsinhibierung oder die prozentuale Kontrollwachstumsrate wurde durch Teilen der Wachstumsrate der arzneimittelbehandelten Zellen durch die Wachstumsrate der nichtbehandelten Kontrollzellen erhalten. Die Arzneimittelkonzentration, die 50% Inhibierung der Kontrollwachstumsrate (IC_{50}) bewirkt, wurde durch die Interpolation der beiden nächsten Werte der Wachstumsinhibierungskurve bestimmt.

[0111] Mitomycin C wurde im Bereich 10^{-8} – 10^{-5} M untersucht. Die liposomalen Formulierungen mit Konjugatbindung wurden im Bereich 10^{-8} – 3×10^{-5} M untersucht. Für Untersuchungen der Wechselwirkung wurde Cystein (SIGMA, St. Louis, MO) zusammen mit Mitomycin C oder Liposomenformulierungen mit einer Endkonzentration von 150 , 500 oder $1000 \mu\text{M}$ zugegeben.

[0112] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und den [Fig. 13](#), 14 und 15A–15B gezeigt.

Beispiel 7

In vivo pharmakokinetische Untersuchungen

A. Liposomenformulierungen

[0113] Liposomen mit Cholesterin und cholesterinfreie Liposomen wurden, wie in den Beispielen 5A und 5B beschrieben, hergestellt.

[0114] Eine Lösung Mitomycin C in freier Form wurde durch Lösen von 11,9 mg Mitomycin C in 119 µl Ethanol hergestellt. Nach dem Lösen wurden ungefähr 11,8 µl einer Lösung aus 10 nM Histidin/150 mM Salz zugegeben. Vor der Verwendung wurde die Mitomycin C-Lösung auf 100 µg/ml mit der Histidin/Salzlösung verdünnt und filtriert.

B. Tiere

[0115] Acht Ratten wurden, wie folgt, zufällig in Behandlungsgruppe eingeteilt:

Ratte Nr.	Gewicht (mg)	Formulierung	MMC-Konz. (mg/ml)	Dosis (ml)	Dosis (mg/kg)
1	262,9	Liposomen mit Chol.	0,088	1,5	0,50
2	268,2	Liposomen mit Chol.	0,088	1,5	0,49
3	263,0	cholesterinfreie Liposomen	0,106	1,5	0,53
4	238,1	cholesterinfreie Liposomen	0,106	1,5	0,67
5	226,0	freies MMC	0,1	2,26	0,66
6	232,0	freies MMC	0,1	2,32	0,88
7	250,0	freies MMC	0,1	2,60	0,80
8	263,0	freies MMC	0,1	2,63	0,59

[0116] Eine einzelne intravenöse Injektion der Testformulierung wurde als eine Bolusdosis verabreicht. Blutproben wurden von jedem Tier zu den nachfolgenden Zeiten nach der Injektion genommen: 30 Sekunden, 15 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden, 8 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden. Die Menge an Mitomycin C in den Blutproben wurde mit dem unten beschriebenen HPLC-Verfahren bestimmt. Eine 200 mM Iodacetamidlösung wurde durch Einbringen von 199,3 Iodacetamid in 5,1 ml 7,5%iges EDTA hergestellt. 15 µl der 200 mM Iodacetamidlösung wurde in jede 1 µl Blutprobe gegeben.

C. HPLC-Verfahren zur Bestimmung von Mitomycin C im Plasma

1. Herstellung der Lösung

[0117] Ein wässrige Puffer enthaltend 10 mM Ammoniumphosphat, pH = 7, wurde durch Einbringen von 1,321 g Ammoniumphosphat in einen 1 l Meßkolben, der mit deionisiertem Wasser gefüllt war, hergestellt. Die Mischung wurde gerührt und der pH wurde auf 7,0 mit o-Phosphorsäure eingestellt. Der Puffer wurde vor der Verwendung mit einem 0,45 µm Nylonfilter filtriert.

[0118] Eine mobile Phase auf Methanol und wässrigem Puffer wurde gegen ein Gradientenprogramm mit einer binären Pumpe von Waters Alliance gemischt.

2. Herstellung einer Standardlösung und Qualitätskontrollproben

[0119] Um nach Gewicht zu trennen, wurden Mitomycin C und Mitomycin C-Konjugat als Standard und Qualitätskontrollproben hergestellt. Ein Milligramm Mitomycin C und Mitomycin C-Konjugat wurden abgewogen und jeweils in 1 ml Lösungsmittel (eine Mischung aus 20% Chloroform und 80% Methanol) gelöst. Die Konzentration der Stocklösung war für beide Verbindungen 1 mg/ml. Verschiedene Verdünnungen wurden als Verdünnungen hergestellt, um Konzentrationen von 5 µg/ml bis 100 µg/ml als Standard- und Qualitätskontrollproben zu erhalten.

[0120] Ein Aliquot 0,1 ml Rattenplasma wurde mit geeigneten Volumina (10 µl–50 µl) Mitomycin C- und Mitomycin C-Konjugat-Standardlösungen versehen. Die Konzentration lag im Bereich von 0,05–5,0 µg/ml und 0,1–5 µg/ml für Mitomycin C bzw. Mitomycin C-Konjugat. Das Endvolumen wurde mit Methanol auf 1 ml eingestellt. Einem ähnlichen Verfahren wurde für die Herstellung der Qualitätskontrollproben gefolgt. Die Konzentrationen der Qualitätskontrollproben betragen 0,1, 0,5 und 5 µg/ml für Mitomycin C und µg/ml für Mitomycin C-Konjugate im Rattenplasma. Die Proben wurden bei 3000 Upm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. 300 µl Überstand wurden in ein HPLC-Fläschchen enthaltend 300 µl Einsätze zur Injektion überführt.

3. Herstellung der Proben

[0121] 100 µl der Plasmaprobe wurde mit 900 µl Ethanol denaturiert und dann 10 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Ein Aliquot mit 300 µl Überstand wurde in ein HPLC-Fläschchen enthaltend 300 µl Einsätze zur Injektion überführt.

4. Chromatographiebedingungen

[0122] Eine Stupleco® C-8,5 μ , 4,6 \times 5 cm Säule wurde verwendet. Die mobile Phase A war 10 mM Ammoniumphosphat pH 7. Die mobile Phase B war Methanol. Die Flußrate betrug 1 ml/Min und der Nachweis wurde mittels UV bei 360 nm geführt. Das Injektionsvolumen betrug 40 μ l und eine typische Laufzeit war 15 Minuten. Das Gradientenprogramm war folgendes:

Zeit (Minuten)	Menge an mobiler Phase A (%)	Menge an mobiler Phase B (%)
0	90	10
4	70	30
8	0	100
12	90	10
15	90	10

5. Assay und Berechnung

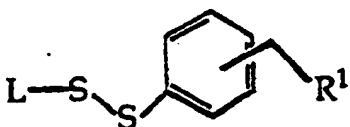
[0123] Die hergestellten linearen Standards (sechs Konzentrationsniveaus) von niedriger bis hoher Konzentration wurden injiziert. Die Qualitätskontroll- und Plasmaproben wurden dann zur Analyse injiziert.

[0124] Die Peakfläche und Retentionszeiten wurden mit dem PE-Nelson Turbochrom (Version 4.1) System bestimmt. Die Konzentrationen von Mitomycin C und Mitomycin C-Konjugat wurden mit einem linearen Regressionsprogramm berechnet. Die Linearität des Verfahrens wurde unter Verwendung der Standarddaten der sechs Konzentrationsniveaus bestimmt. Die Daten wurden an die lineare Regressionsgleichung $y = B \cdot x + A$ mit einem Gewichtungsfaktor von $1/x^2$ angepaßt. Die Genauigkeit und Richtigkeit des Verfahrens wurde aus den rückwärts bestimmten Konzentrationen der Standards ebenso wie aus den Qualitätskontrollproben berechnet.

[0125] Die Ergebnisse sind in den [Fig. 16A–Fig. 16B](#) gezeigt.

Patentansprüche

1. Konjugat zur Verwendung in einem liposomalen Vehikel zur Arzneimittelfreisetzung, das Konjugat Verbindung hat die allgemeine Strukturformel:



wobei L eine Distearoylglycerinkomponente ist, die zur Einlagerung in eine liposomale Lipiddoppelschicht geeignet ist, R^1 stellt eine Mitomycin-A- oder Mitomycin-C-Komponente dar, die über eine Urethangruppe kovalent an die Dithiobenzylkomponente gebunden ist und wobei die Orientierung der CH_2R^1 -Gruppe ausgewählt wird aus der ortho-Position oder der para-Position.

2. Liposomzusammensetzung, umfassend Liposome, die ein vesikelbildendes Lipid umfassen, das etwa 1 bis etwa 30 Molprozent einer Verbindung nach Anspruch 1 einschließt.

3. Verfahren zum Zurückhalten eines Arzneimittels in einem Liposom, umfassend die Herstellung von Liposomen wie in Anspruch 2 definiert, wobei die Herstellung dadurch wirksam ist, dass das Arzneimittel in dem Liposom zurückgehalten wird, bis die Freisetzung aus der Verbindung als Antwort auf einen physiologischen Zustand oder einen artifiziell induzierten Zustand erfolgt.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

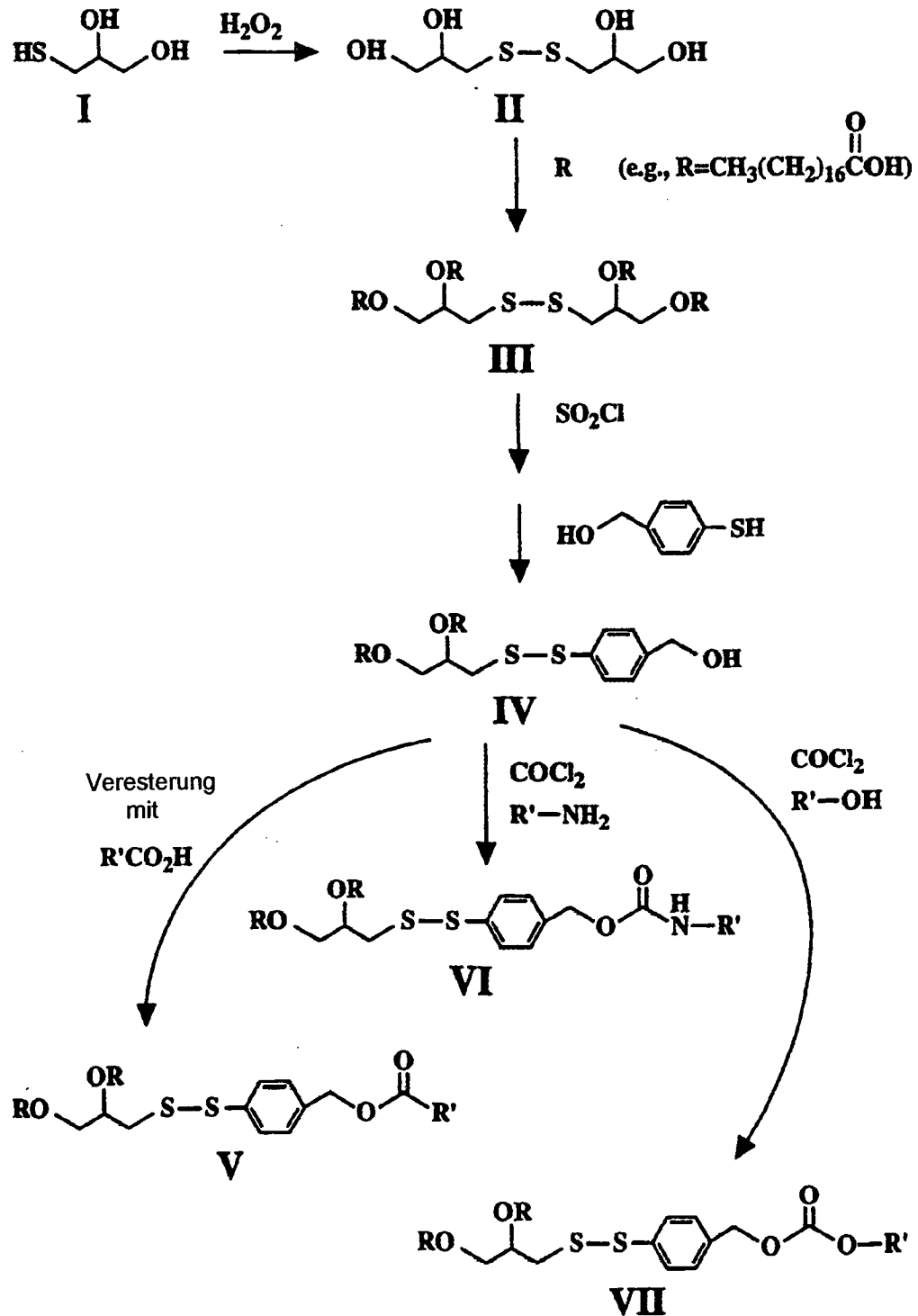


Fig. 1

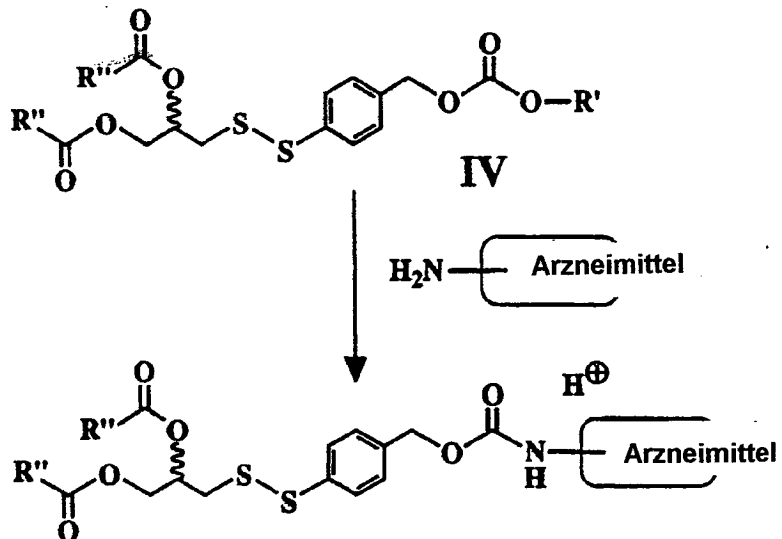


Fig. 2A

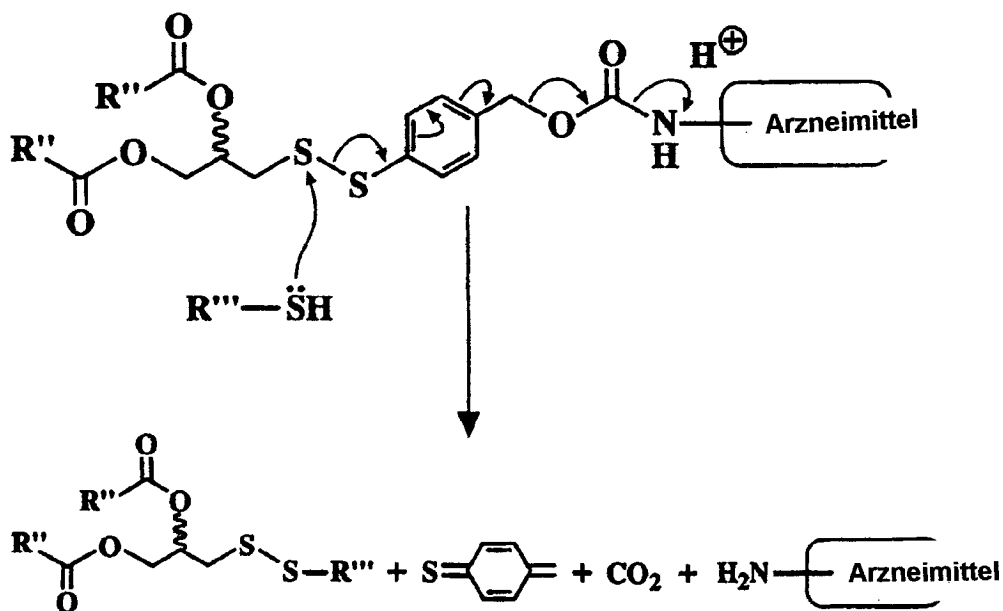


Fig. 2B

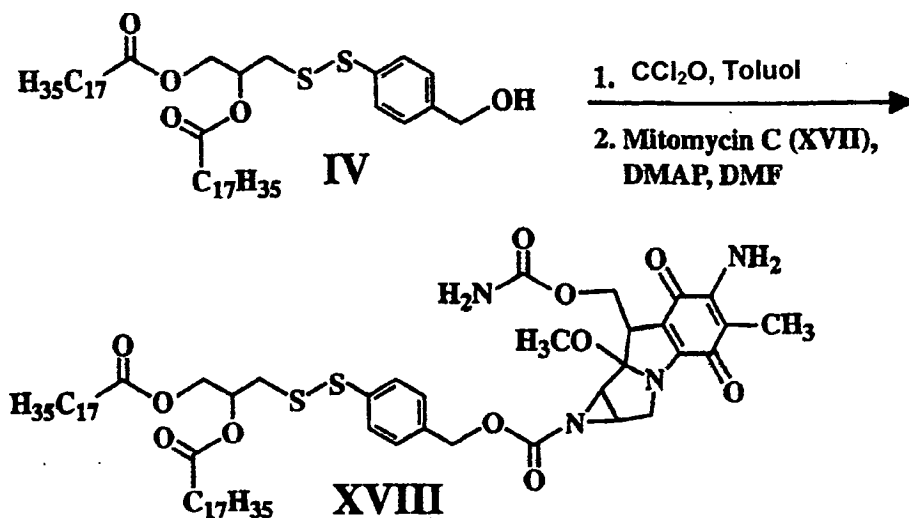


Fig. 6A

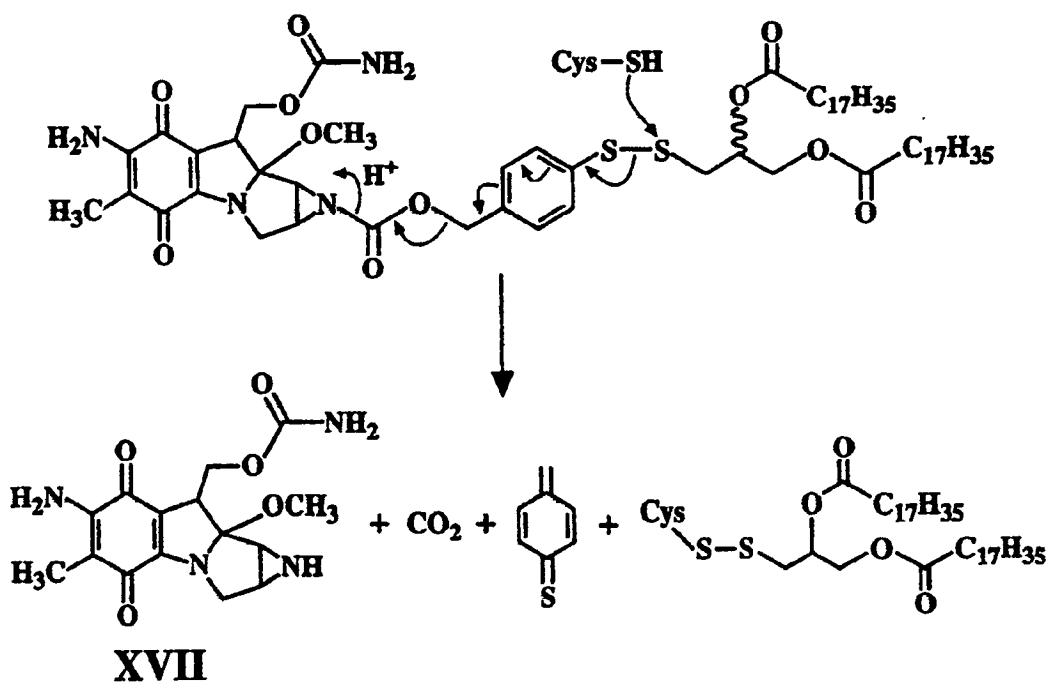


Fig. 6B

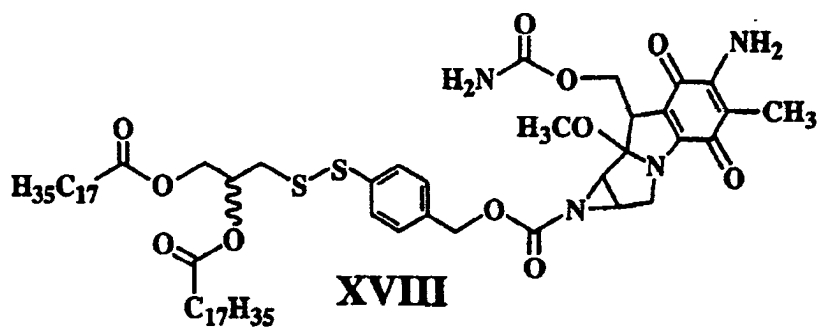


Fig. 9A

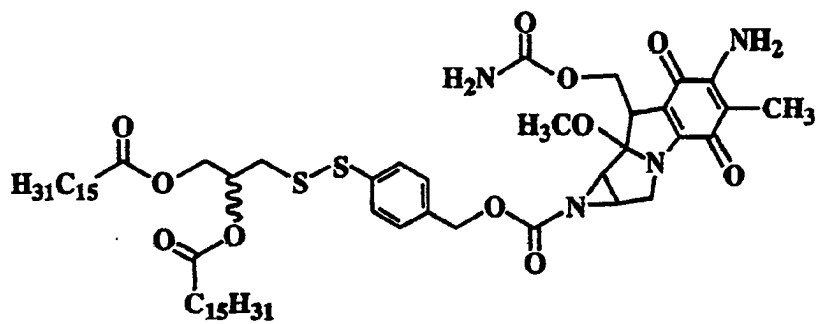


Fig. 9B

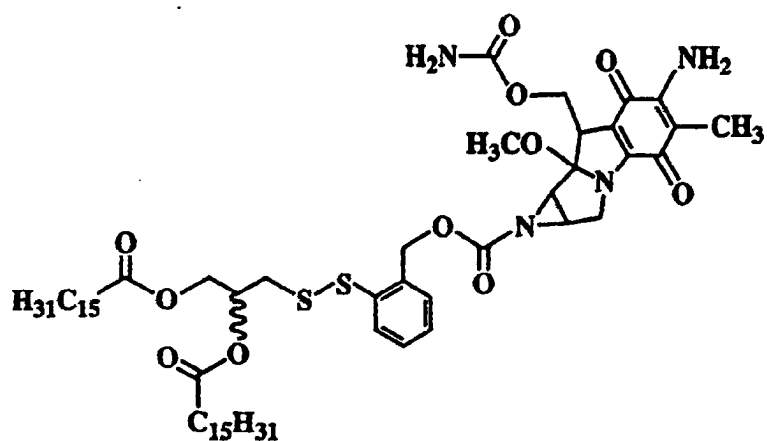


Fig. 9C

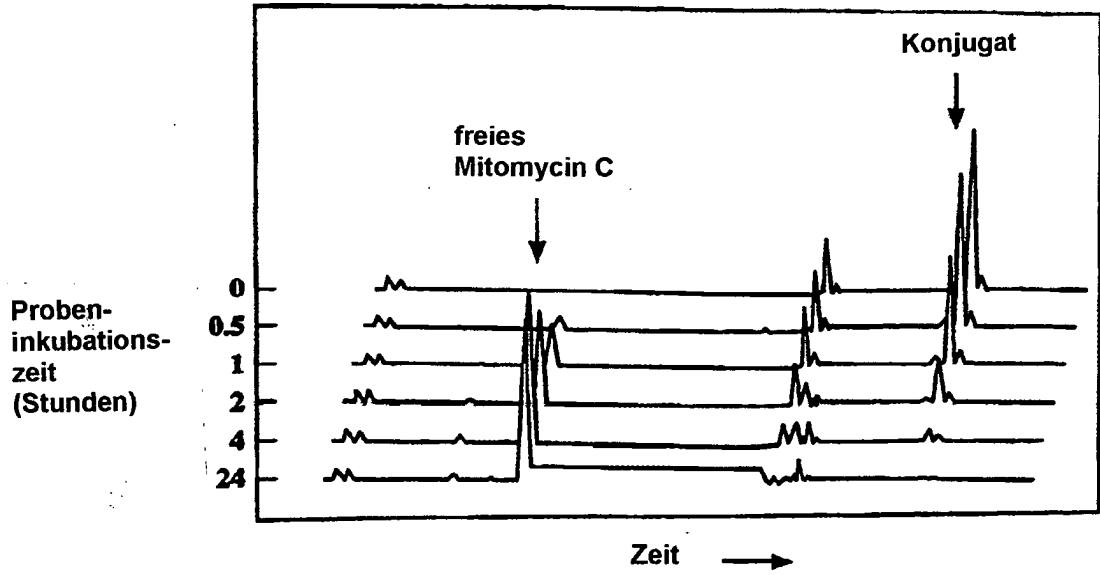


Fig. 10A

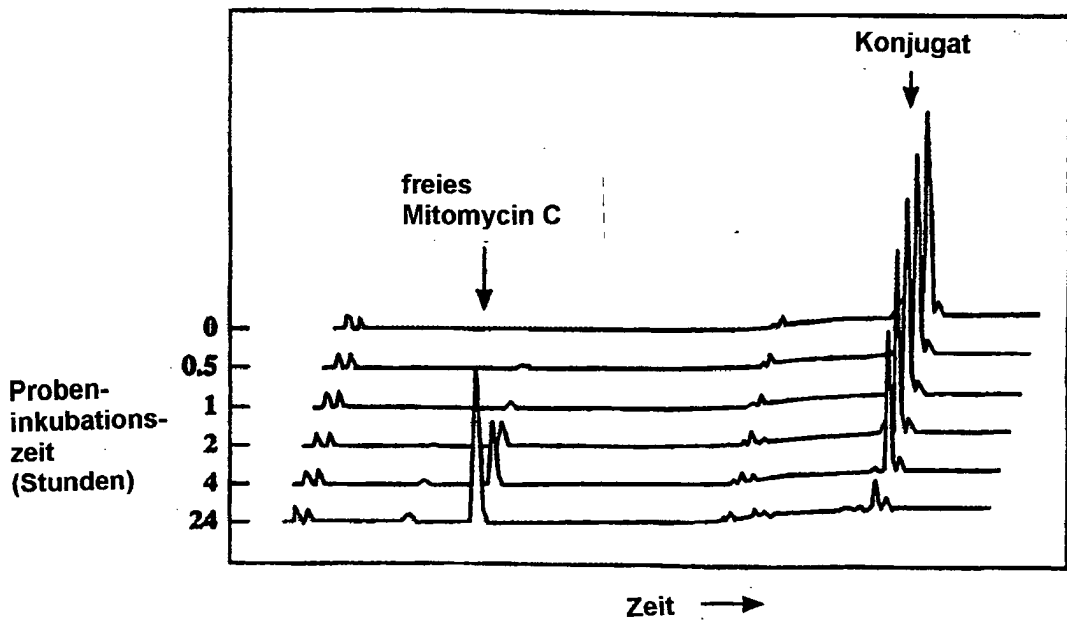


Fig. 10B

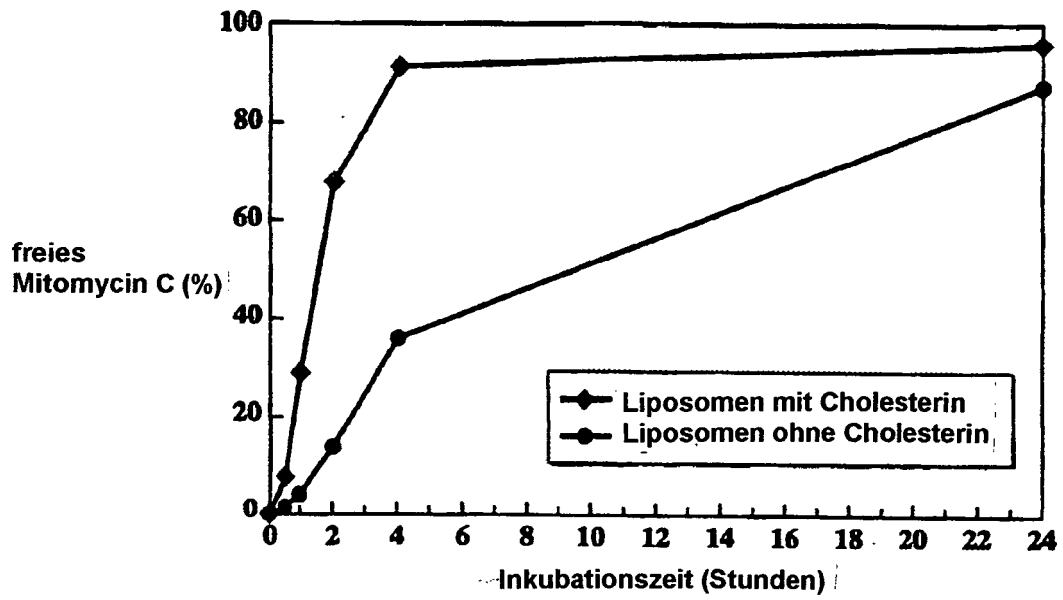


Fig. 11

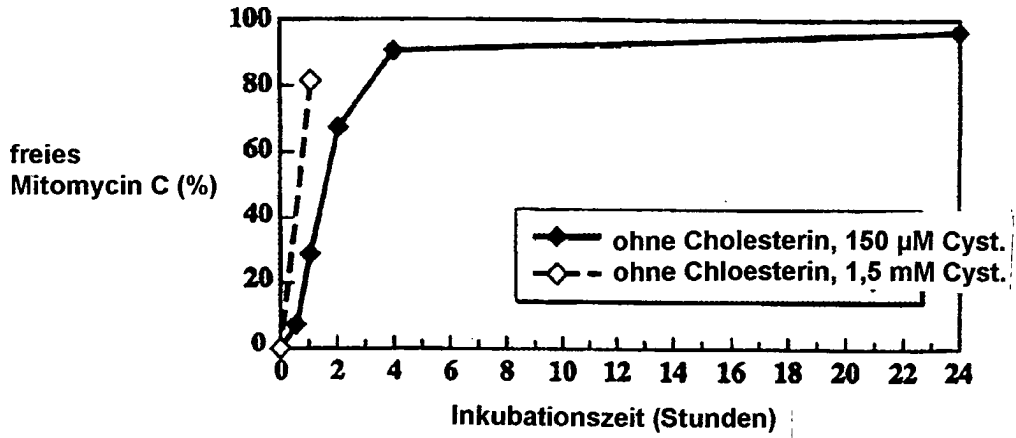


Fig. 12A

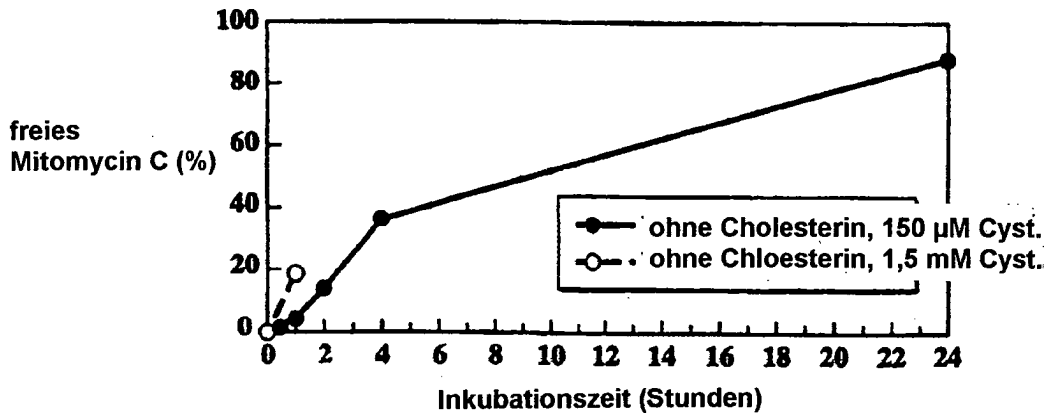


Fig. 12B

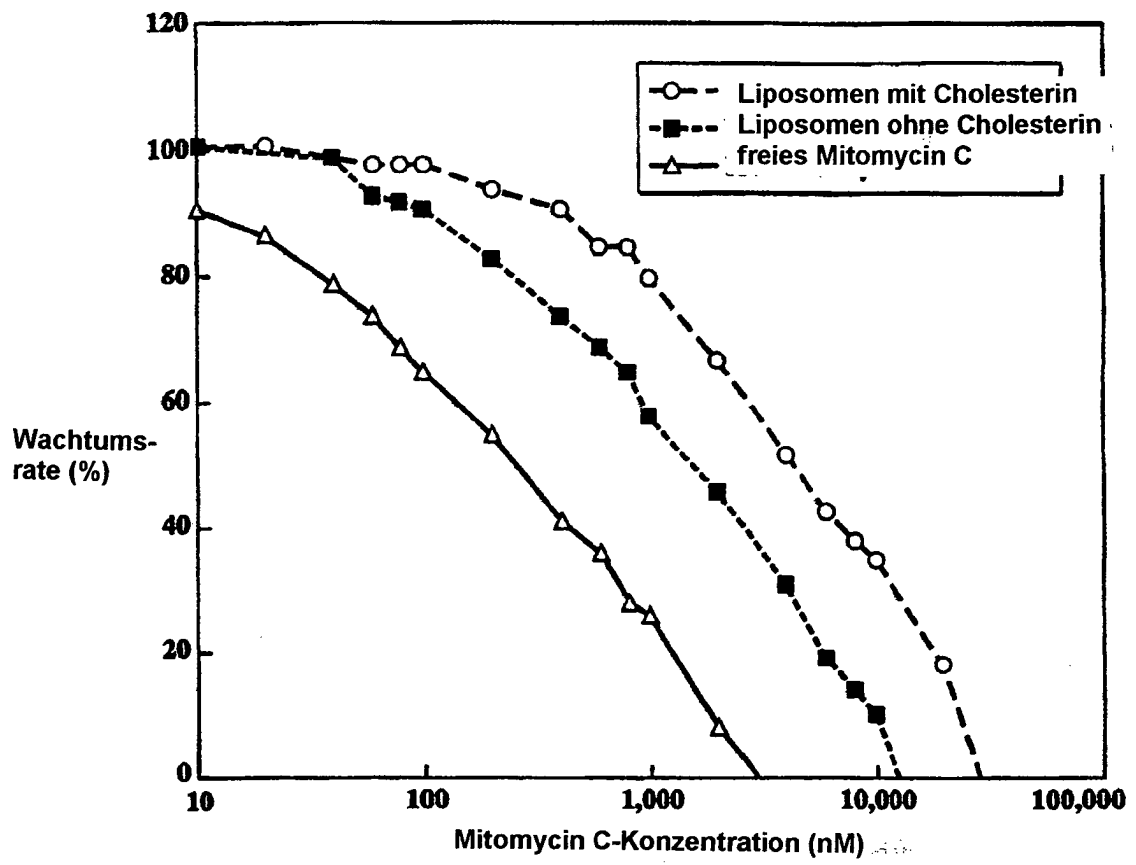


Fig. 13

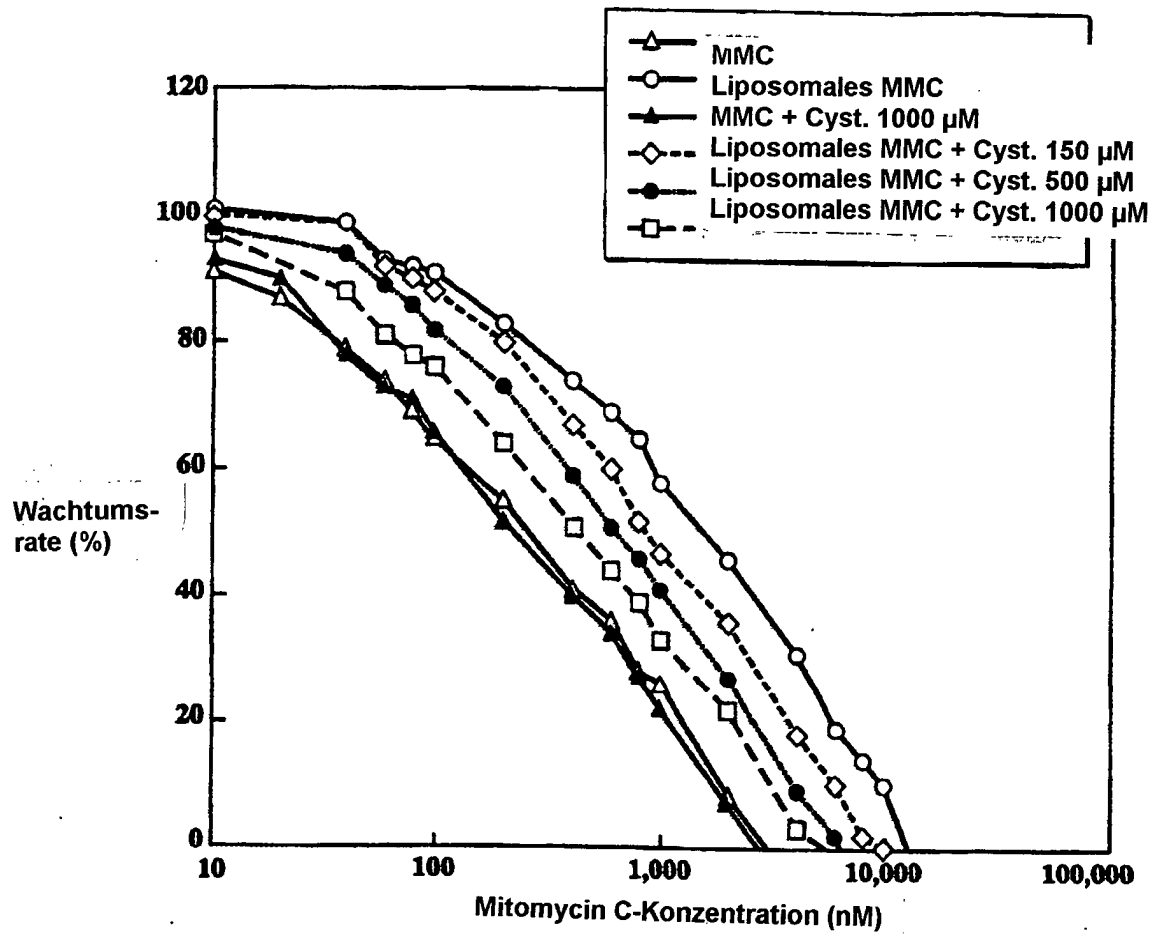


Fig. 14A

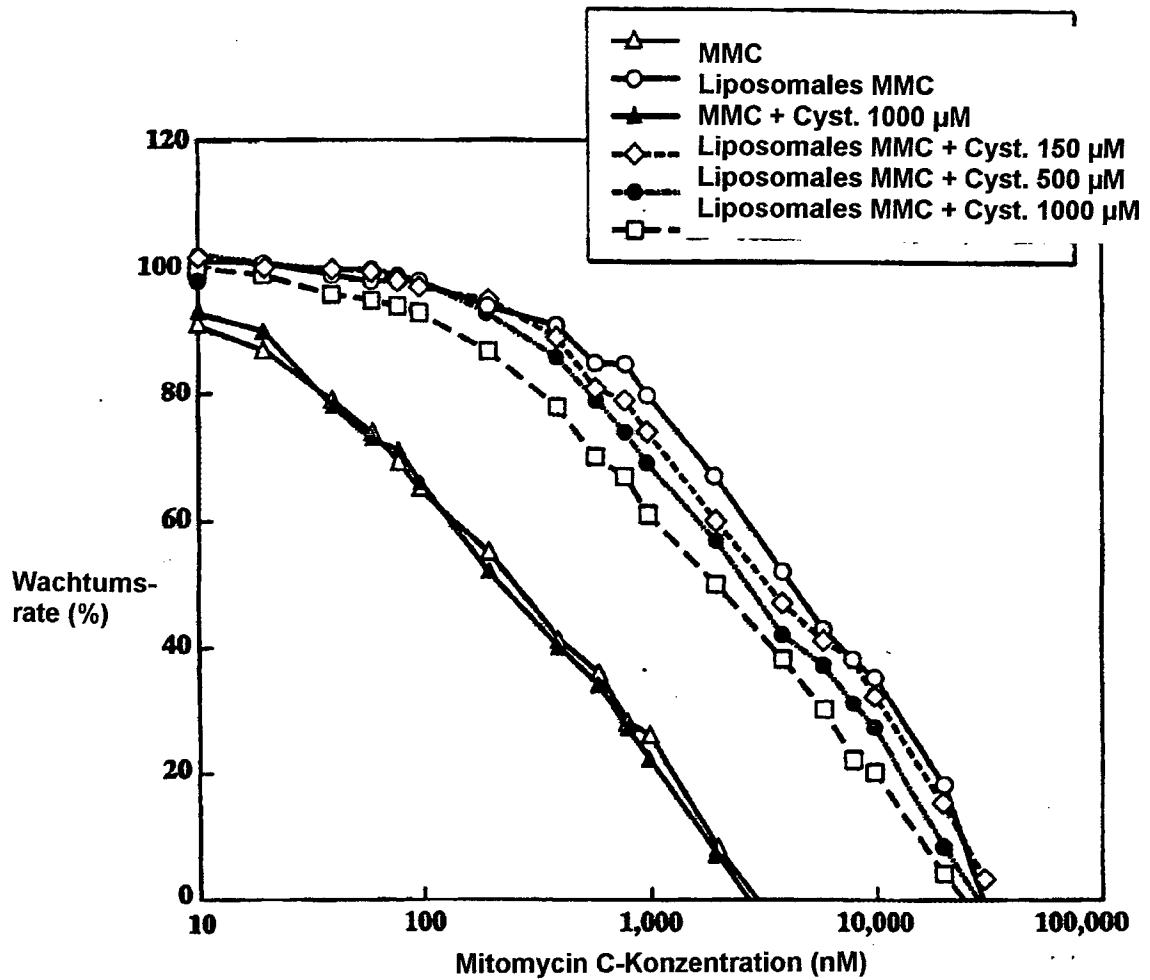


Fig. 14B

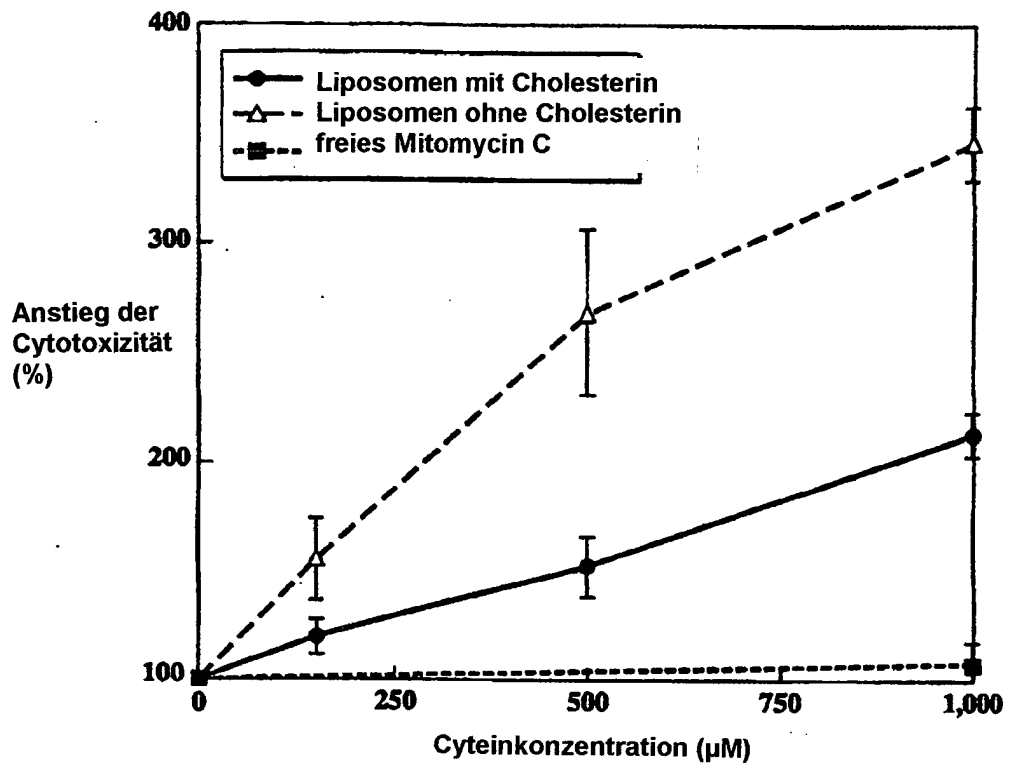


Fig. 15

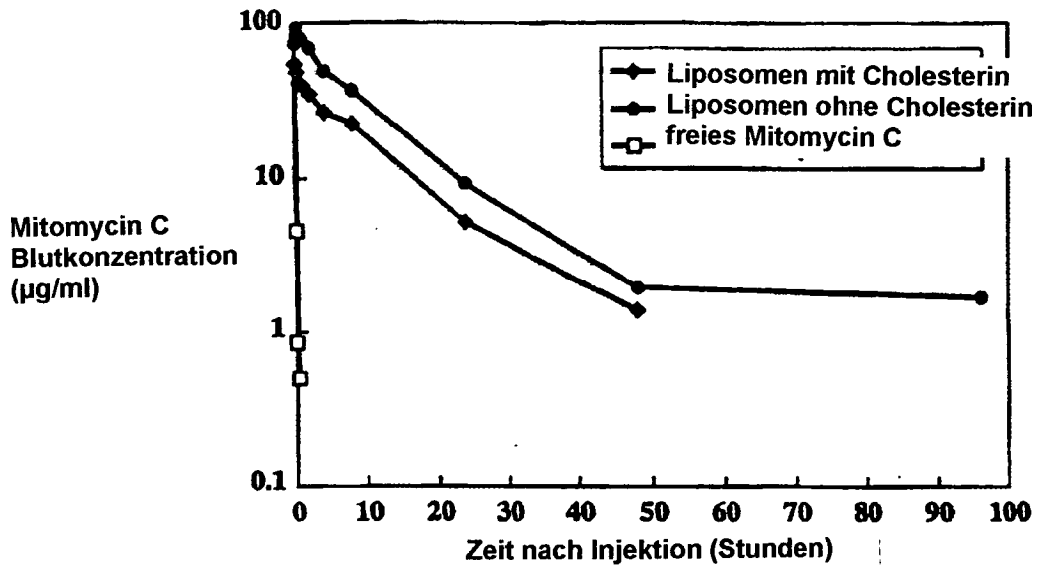


Fig. 16A

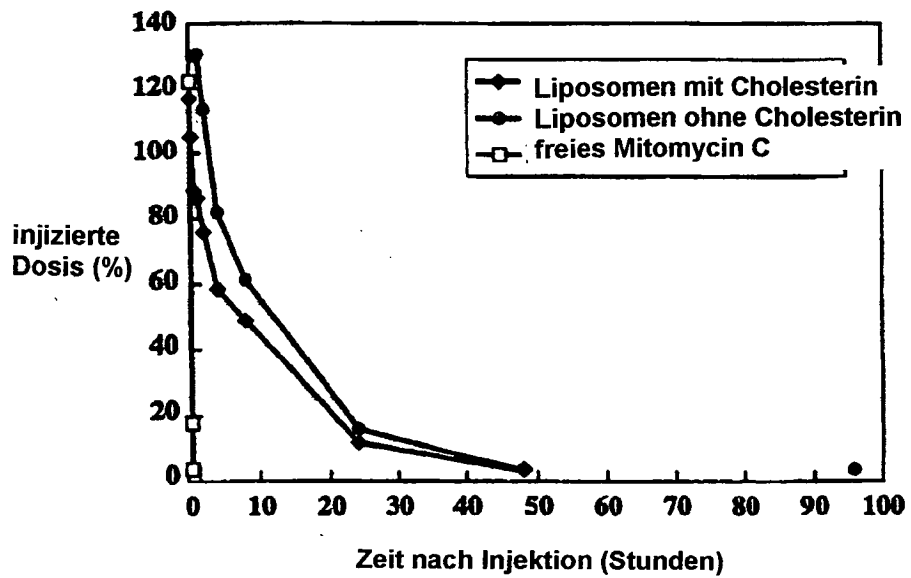


Fig. 16B