



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 285 721 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 L 2/08

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD A 61 L / 330 499 B	(22)	06.07.89	(44)	03.01.91
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Franck, Ulrich, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys.; Sprinz, Helmut, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys.; Schäfer, Heinz, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Winkler, Eckart, Dr. sc. Dipl.-Phys., DD
(73)	Akademie der Wissenschaften, Zentralinstitut für Isotopen- und Strahlenforschung, Permoserstraße 15, Leipzig, 7050, DD
(74)	siehe (73)

(54)	Verfahren zur Sterilisation wäßriger Lösungen von Liposomen mittels ionisierender Strahlung
------	---

(55) Liposomen; wäßrige Dispersion; Sterilisation; ionisierende Strahlung; Chloridzusatz

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sterilisation (oder auch nur zur Keimzahlverminderung) wäßriger Lösungen von Liposomen, die als Arzneimittelträger (Carrier) dienen sollen, mittels ionisierender Strahlung. Der Lösung wird vor der Bestrahlung ein lösliches Chlorid in Konzentrationen > 100 mM, am besten NaCl in physiologischer Konzentration, zugesetzt.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Sterilisation wäßriger Lösungen von Liposomenmittels ionisierender Strahlung, dadurch gekennzeichnet, daß der Lösung vor der Bestrahlung ein lösliches Chlorid in Konzentrationen > 100 mM zugesetzt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß NaCl in physiologischen Konzentrationen zugesetzt wird.

Titel

Verfahren zur Sterilisation wäßriger Lösungen von Liposomen mittels ionisierender Strahlung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sterilisation (oder auch nur zur Keimzahlverminderung) wäßriger Lösungen von Liposomen, die als Arzneimittelträger (Carrier) dienen sollen, mittels ionisierender Strahlung.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die als Arzneimittelträger einzusetzenden Liposomen müssen den entsprechenden Sterilitätsanforderungen genügen. Die in der pharmazeutischen Industrie allgemein angewandten Sterilisationsverfahren (Hitzesterilisation, chemische Sterilisation) sind im Falle wäßriger Liposomendispersionen nicht oder sehr schlecht geeignet.

Bekannt ist auch die Verwendung ionisierender Strahlung für Zwecke der Sterilisation. Aber auch dieses Verfahren ist für Liposomen nicht einsetzbar, da infolge der indirekten Strahlenwirkung über die durch die Wasserradiolyse auftretenden Radikale die Barrierefunktion der Liposomenmembran verloren geht.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die Sterilisation von für medizinische Zwecke vorgesehenen Liposomendispersionen zu erreichen, ohne daß die Carriereigenschaften der Liposomen vermindert wird.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, solche Bedingungen für die Sterilisation wäßriger Lösungen von Liposomen zu finden, daß die Liposomen weder Strahlenschäden erleiden noch eine negative Beeinflussung ihrer Carriereigenschaften auftritt.

Erfindungsgemäß wird das erreicht, indem der Lösung ein lösliches Chlorid in Konzentrationen > 100 mM, insbesondere NaCl in physiologischer Konzentration (140 - 150 mM), zugesetzt wird. Überraschend wurde gefunden, daß das Chloridion die geforderte Schutzfunktion auch bei den hohen pH-Werten der Liposomendispersionen (> 5) ausübt. Bisher wurden Radikalfängereigenschaften des Chloridions nur bei tiefen pH-Werten beobachtet (M. Anbar, J. K. Thomas, J. Phys. Chem. 68 (1964) 3829).

Der Zusatz von Chlorid genügt nicht nur den oben genannten Forderungen (Schutz der Liposomen vor Strahlenschäden, keine negative Beeinflussung der Carriereigenschaften durch Wechselwirkung mit der Liposomenmembran), sondern hat noch den weiteren Vorteil, daß keinerlei Bedenken bei der Anwendung auch am Menschen gibt. Hinzu kommt als weiterer Vorteil die leichte Handhabbarkeit.

Die zu applizierende Dosis hängt von den jeweiligen konkreten Bedingungen ab. Um aber eine zeit- und kostenaufwendige Prüfung der Sterilisation jeder bestrahlten Charge zu vermeiden, wird eine Dosis von 25 kGy empfohlen, da gemäß Arzneimittelgesetz der DDR ein Arzneimittel dann ohne Prüfung der Sterilisation als "strahlensterilisiert" bezeichnet werden kann.

Es ist günstig, die Strahlenbehandlung mit einer möglichst hohen Dosisleistung (> 20 Gy/min, noch besser > 40 Gy/min) und bei Temperaturen wenig oberhalb des Gefrierpunktes (z.B. bei etwa 5°C) vorzunehmen. Als weitere Maßnahme ist auch die Sättigung der Liposomendispersion vor der Strahlenbehandlung mit Stickstoff oder einem anderen Inertgas empfehlenswert.

Werden die so behandelten Dispersionen bei Temperaturen wenig oberhalb des Gefrierpunktes aufbewahrt, dann sind sie über längere Zeiträume (> 1 - 2 Monate) haltbar und einsetzbar.

Die Vorteile der Erfindung bestehen darin, daß die Sterilisation von wäßrigen Liposomendispersionen mittels ionisierender Strahlung durchgeführt werden kann, wobei der für den Erhalt der Carrierfunktion notwendige Schutz der Liposomenmembran mit einem einfachen, billigen, beliebig verfügbaren, in der Anwendung am Menschen verträglichen (im menschlichen Organismus natürlich vorkommenden) Zusatzstoff erreicht wird.

Ausführungsbeispiel

Liposomen aus Hühnereigelblecithin werden im Ultraschallbad (Rüsselbeschaller, 9 Minuten, 20 kHz, Eis/Wasser-Bad, Argonatmosphäre) dispergiert (J. Schreiber, Pharmazie 34 (1979) 36). Proben der Liposomendispersion werden mit einem löslichen Chlorid unterschiedlicher Konzentration versetzt und der Gammastrahlung einer Co-60-Quelle ausgesetzt. Dabei wurde die Dosisleistung variiert. Die Schutzwirkung des Chlorids wird mit kernmagnetresonanzspektroskopischen Methoden beobachtet - es wird die Barrierefunktion der Liposomenmembran und die Einschränkung der Beweglichkeit der Cholin Kopfgruppen der verwendeten Lecithinmoleküle gemessen. Dabei stellt die Barrierefunktion einen Parameter dar, der in direkter Beziehung zur Verwendbarkeit als Arzneimittelcarrier steht (Dichtigkeit gegenüber unerwünschtem vorzeitigem Austritt des Wirkstoffes aus dem Liposom). Zur Testung der Barrierefunktion der Liposomenmembran wird das Eindringen von paramagnetischen Eu^{3+} -Ionen beobachtet.

Ein Teil der Ergebnisse ist in den nachfolgenden Tabellen enthalten.

Tabelle 1:

Permeationsraten erster Ordnung von Eu^{3+} durch Liposomenmembranen, die für die ersten 10 Tage nach Bestrahlung bestimmt wurden.

(Die Proben waren bei der Bestrahlung und bei der Lagerung luftgesättigt.)

NaCl-Konz. (mM)	Dosis (kGy)	Dosisleist. (Gy/min)	Lagertemp. (°C)	Penetrationsrate ($\text{h}^{-1} \cdot 10^{-4}$)
10	15,3	3,8	20	9,5
30				3,4
60				2,0
100				1,0
150				0,8
10	15,3	3,8	5	4,1
30				1,2
60				0,5
100				0,5
150				< 0,1
10	15,3	45,6	5	< 0,1
30				
60				
100				
150				

Tabelle 2:

Permeationsraten erster Ordnung von Eu^{3+} durch Liposomenmembranen für die ersten 10 Tage nach Bestrahlung luftgesättigter Proben

Salz	Salz-Konz. (mM)	Penetrationsrate ($\text{h}^{-1} \cdot 10^{-4}$)
NaCl	20	4,7
KCl	20	3,2
K_2SO_4	20	39,6
NaAc/HAc	20/200	20,2
NaClO_4	20	6,1

Tabelle 3:

Beweglichkeitsverringernach Bestrahlung

(Als Maß dient das Verhältnis von transversaler NMR-Relaxationszeit T_{2V} vor zu T_{2N} nach der Bestrahlung.)

NaCl-Konz. (mM)	Probe gesättigt mit	Beweglichkeitsverring. (T_{2V}/T_{2N})
0	Luft	0,59
20	Luft	0,67
0	N_2	0,71
150	Luft	0,71
150	N_2	0,77

Bei den Versuchen der Tabellen 2 und 3 wurden folgende Bedingungen eingehalten: Dosis 13,5 kGy, Dosisleistung 3,4 Gy/min und Lagertemperatur 20 °C.

In allen Fällen betrug die Lipidkonzentration 0,05 kg/kg Dispersion.

Mit 25 kGy bestrahlte Proben mit einer NaCl-Konzentration von 150 mM werden bei 20 °C gelagert. Nach 35 Tagen kann noch keine Permeation von Eu^{3+} -Ionen durch die Liposomenmembran nachgewiesen werden.