



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 15 044 T2** 2006.08.03

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 299 084 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 15 044.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA01/00925**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 949 141.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/002077**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.06.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.01.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.04.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **16.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 9/127** (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

215556 P	30.06.2000	US
264616 P	26.01.2001	US

(73) Patentinhaber:

**Inex Pharmaceuticals Corp., Burnaby, British
Columbia, CA**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MADDEN, D., Thomas, Vancouver, CA; SEMPLE,
Sean C., Vancouver, CA; AHKONG, F., Quet,
Surrey, CA**

(54) Bezeichnung: **LIPOSOMALE ANTINEOPLASTISCHE ARZNEIMITTEL UND DEREN VERWENDUNGEN**

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**Hintergrund der Erfindung**

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf liposomale Zusammensetzungen und auf Verfahren zum Verwenden solcher Zusammensetzungen zum Behandeln von Neoplasien und zum Verhindern von Angiogenese.

[0002] Viele gegen Krebs gerichtete und antineoplastische Arzneimittel wurden in Liposome verkapselt. Diese beinhalten Alkylantien, Nitrosoharnstoffe, Cisplatin, Antimetaboliten und Anthracycline. Untersuchungen mit Liposomen, die Anthracyclin-Antibiotika enthalten, haben klar eine Reduktion der Kardiotoxizität und der Hauttoxizität und eine Verlängerung der Überlebenszeit von tumortragenden Tieren im Vergleich zu Kontrollen, die das freie Arzneimittel erhielten, gezeigt.

[0003] Liposomale gegen Krebs gerichtete Medikamente modifizieren die Pharmakokinetik der Arzneimittel im Vergleich zu ihren freien Arzneimittel-Pendants. Für eine liposomale Arzneimittelformulierung wird die Pharmakokinetik des Arzneimittels weitgehend von der Rate, mit welcher der Träger aus dem Blut eliminiert wird, und von der Freisetzungsrate des Arzneimittels aus dem Träger bestimmt werden. Es wurden beträchtliche Anstrengungen unternommen, Zusammensetzungen liposomaler Träger, die eine langsame Elimination aus dem Blut aufweisen, zu identifizieren und in zahlreichen wissenschaftlichen Publikationen und Patenten wurden lange zirkulierende Träger beschrieben. Es wurden auch Anstrengungen unternommen, Kontrolle über die Arzneimittelverluste aus liposomalen Trägern zu erhalten, indem zum Beispiel das Transmembranpotenzial benutzt wurde, um die Freisetzung zu steuern.

[0004] Therapeutische Camptothecine wie zum Beispiel Topotecan (9-Dimethylaminomethyl-10-hydroxy-camptothecin, HycamtinTM) und Irinotecan sind halbsynthetische wasserlösliche Derivate von Camptothecin, einem Alkaloid, das aus dem Stammholz des chinesischen Baumes *Camptotheca acuminata* extrahiert wird (Wall, et al., J. Am. Chem. Soc. 88: 3888–3890 (1966)). Camptothecine gehören zur Klasse der Topoisomerasehemmer von antineoplastischen Wirkstoffen, die spezifisch die Aktivität des im Kern befindlichen Enzyms Topoisomerase I, das an der Replikation der DNA beteiligt ist, hemmen (Hsiang, et al., Cancer Res. 48: 1722–1726 (1988)). Als solches zeigt Topotecan einen zellzyklusspezifischen Wirkmechanismus, indem es während der S-Phase (Replikation der DNA) wirkt, um irreversible Doppelstrangbrüche in der DNA zu verursachen, die schließlich zu einem G2-Zellzyklusarrest und zur Apoptose führen. In der freien Form hat das Medikament ein breites Aktivitätsspektrum gegen eine Reihe von Tumorzelllinien und Maus-Allograft- und Mensch-Xenograft-Tumormodelle (McCabe, F. L. et al., Cancer Invest 12: 308–313 (1994), Emerson, et al., Cancer Res. 55: 603–609 (1995), Thompson, Biochim. Biophys. Acta 1400: 301–319 (1998), Ormrod, et al., Drugs 58: 533–551 (1999), Hardman et al., Anticancer Res. 19: 2269–2274 (1999)). In jüngerer Zeit stellten sich Hinweise darauf heraus, dass Topotecan starke antiangiogenetische Eigenschaften, die zu seinem Wirkmechanismus gegen Tumoren beitragen können, hat (O'Leary, et al., Clin. Cancer Res. 5: 181–187 (1999), Clements, et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 44: 411–416 (1999)). All diese Therapien sind mit einer die Dosis limitierenden Toxizität wie zum Beispiel mit nicht kumulativer Myelosuppression, die zu Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie führt, und mit einer den Gastrointestinaltrakt betreffenden Toxizität einschließlich Mucositis und Diarrhoe verbunden. Klinisch wurde Topotecan zur Zweitlinientherapie beim Ovarialkarzinom und beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) zugelassen und steht gegenwärtig im Mittelpunkt einer umfangreichen klinischen Evaluierung.

[0005] Lipidformulierungen von Camptothecinen wurden als therapeutische Wirkstoffe vorgeschlagen (siehe U.S. Patent Nr. 5.552.156 und PCT Publikation Nr. WO 95/08986). Jedoch sind nicht alle Lipidformulierungen zu Zwecken der Arzneimittelabgabe gleichwertig und ausführliche Forschungsarbeiten erstrecken sich auf Formulierungen, die bevorzugte Eigenschaften zur Beladung mit Arzneimittel und Aufbewahrung, zur Verabreichung von Arzneimittel, Pharmakokinetik, Bioverteilung, Leckrate, Akkumulation im Tumor, Toxizitätsprofil und Ähnliches aufweisen. Bei Camptothecinen ist dieses Gebiet zusätzlich kompliziert, weil bei Menschen dosislimitierende Toxizitäten 10-fach geringer sein können als bei Mäusen (Erickson-Miller, et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 39: 467–472 (1997)).

[0006] Verbesserte liposomale Formulierungen antineoplastischer Wirkstoffe könnten sich als sehr nützlich erweisen. Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, lipidformulierte antineoplastische Wirkstoffe, die einen neuen klinischen Nutzwert haben, bereitzustellen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen, die für das Modulieren der Halbwertszeit der Plasmazirkulation eines Wirkstoffs (z.B. Topotecan) nützlich sind, bereit. Die liposomalen Formulierungen haben eine erhöhte klinische Wirksamkeit und eine verminderte begleitende Toxizität. Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung Verfahren und liposomale Zusammensetzungen zum Behandeln von Neoplasie und zum Verhindern von Angiogenese bereit.

[0008] Als solche sind die liposomalen Formulierungen gemäß der Erfindung zum Modulieren der Halbwertszeit der Plasmazirkulation eines Wirkstoffs geeignet. Überraschenderweise ist es durch Ändern der Wirkstoffmenge, die im Liposom präzipitiert ist, möglich, die Kinetik der Freisetzung des Wirkstoffs in das Plasma zu modulieren. Bevorzugte Wirkstoffe sind antineoplastische Arzneimittel wie zum Beispiel ein Camptothecin (z.B. Topotecan).

[0009] In einer anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine liposomale Formulierung bereit, umfassend: a) ein antineoplastisches Arzneimittel und b) ein Liposom, das freies antineoplastisches Arzneimittel und präzipitiertes antineoplastisches Arzneimittel hat, wobei das präzipitierte Arzneimittel im Liposom mindestens 50% des gesamten antineoplastischen Arzneimittels ausmacht. Durch Bemessen der Menge von präzipitiertem antineoplastischen Arzneimittel im Liposom ist es möglich, die Freisetzung des Arzneimittels sowie in vitro als auch in vivo zu steuern. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen führen hohe intraliposomale Konzentrationen des Wirkstoffs (z.B. Topotecan) zu einer hohen Menge der präzipitierten Form. In dieser Hinsicht sind die nachfolgenden Freisetzungsraten des Arzneimittels in vivo langsam. Unter bestimmten Gesichtspunkten ist eine langsame Freisetzungsrate im Vergleich zu einer schnellen Freisetzungsrate vorzuziehen und wirkungsvoller.

[0010] In noch einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine liposomale Formulierung bereit, umfassend: a) einen Wirkstoff, b) ein Liposom, das darin verkapselt freien Wirkstoff und präzipitierten Wirkstoff hat und c) ein leeres Liposom.

[0011] In dieser Hinsicht wird die Serumhalbwertszeit des Liposoms durch das Einbeziehen leerer Liposomen in die Formulierung verlängert. Für Fachleute wird es leicht ersichtlich sein, dass jedes aus einer Reihe von Lipiden verwendet werden kann, um die liposomalen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zu bilden. In einer derzeit bevorzugten Ausführungsform umfasst das Lipid eine Mixtur aus Sphingomyelin und Cholesterin, bevorzugterweise in einem Verhältnis von Sphingomyelin:Cholesterin (molares Verhältnis) von etwa 30:70 bis etwa 60:40. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Liposom Sphingomyelin und Cholesterin in einem Verhältnis von 55:45.

[0012] In noch einem anderen Aspekt ist die vorliegende Erfindung auf die Verwendung liposomaler Formulierungen in der Herstellung eines Medikaments zum Behandeln eines soliden Tumors bei einem Menschen, der daran leidet, gerichtet, das Verabreichen einer wirksamen Menge einer liposomalen Formulierung der vorliegenden Erfindung in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger an einen Menschen umfassend. Eine Reihe von soliden Tumoren kann unter Verwendung der Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung behandelt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der zu behandelnde solide Tumor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus soliden Tumoren der Lunge, der Mamma, des Kolons und der Prostata. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren weiterhin die gleichzeitige Verabreichung einer Behandlung oder eines Wirkstoffs; der zum Behandeln einer Neutropenie oder eines Plättchenmangels geeignet ist.

[0013] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein liposomales Topotecan zur Herstellung eines Medikaments zum Behandeln solider Tumore verwendet. Darüber hinaus wird es Fachleuten leicht ersichtlich sein, dass jedes aus einer Reihe von Lipiden verwendet werden kann, um die liposomalen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zu bilden.

[0014] Andere Merkmale, Aufgaben und Vorteile der Erfindung und ihrer bevorzugten Ausführungsformen werden aus der ausführlichen Beschreibung, die folgt, ersichtlich werden.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0015] **Fig. 1A–C** zeigt das pharmakokinetische Verhalten einer liposomalen Formulierung von Vinorelbin. Element A zeigt die Arzneimittelverlusten aus zirkulierenden Trägern für drei Formulierungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von Arzneimittel:Lipid (0,1:1, 0,2:1, 0,3:1). Die Arzneimittelfreisetzung ist vom Ver-

hältnis von Arzneimittel:Lipid abhängig, wobei die langsamste Freisetzungsrates beim höchsten Verhältnis (0,3:1) beobachtet wurde. Element B zeigt die Lipidausbeute im Blut. Element C zeigt, dass eine Regulierung der Raten der Arzneimittelfreisetzung aus dem Träger zu Änderungen der Halbwertszeit für die Blutclearance von Vinorelbin führt.

[0016] **Fig. 2A**–C zeigt ein entsprechendes Verhalten, wenn die Plasmaspiegel des Arzneimittels dazu benutzt werden, die Pharmakokinetik zu verfolgen. Element A zeigt die Arzneimittelretention gegen die Zeit. Element B zeigt die Lipidausbeute gegen die Zeit. Element C zeigt die Arzneimittelausbeute gegen die Zeit.

[0017] **Fig. 3A**–C zeigt das pharmakokinetische Verhalten von Formulierungen von liposomalem Vinblastin als Funktion des Verhältnisses von Arzneimittel:Lipid (Blut PK). Der Arzneimittelverlust aus dem liposomalen Träger wird vom anfänglichen Verhältnis von Arzneimittel:Lipid mit einer langsameren Freisetzung bei Formulierungen mit einem höheren Arzneimittelverhältnis bestimmt. Element A zeigt die Arzneimittelretention gegen die Zeit. Element B zeigt die Lipidausbeute gegen die Zeit. Element C zeigt, dass Arzneimittelfreisetzungsraten mit Änderungen der Halbwertszeit der Arzneimittelclearance aus dem Blut korrelieren.

[0018] **Fig. 4A**–C zeigt das pharmakokinetische Verhalten von Formulierungen von liposomalem Vinblastin als Funktion des Verhältnisses von Arzneimittel:Lipid (Plasma PK). Element A zeigt die Arzneimittelretention gegen die Zeit. Element B zeigt die Lipidausbeute gegen die Zeit. Element C zeigt, dass Arzneimittelfreisetzungsraten mit Änderungen der Halbwertszeit der Arzneimittelclearance aus dem Plasma korrelieren.

[0019] **Fig. 5A**–C zeigt den Einfluss der Lipiddosis auf das PK Verhalten (Blut PK). Wie hierin, gezeigt werden über einen Bereich der Lipiddosierung von 16,6 mg/kg bis 50 mg/kg ähnliche Raten der Arzneimittelfreisetzung (A), der Lipidclearance (B) und der Arzneimittelclearance (C) für eine liposomale Vinblastinformulierung mit einem Verhältnis von Arzneimittel:Lipid von 0,3:1 beobachtet.

[0020] **Fig. 6A**–C zeigt den Einfluss der Lipiddosis auf das PK Verhalten (Plasma PK). Wie hierin gezeigt werden über einen Bereich der Lipiddosierung von 16,6 mg/kg bis 50 mg/kg ähnliche Raten der Arzneimittelfreisetzung (A), der Lipidclearance (B) und der Arzneimittelclearance (C) für eine liposomale Vinblastinformulierung mit einem Verhältnis von Arzneimittel:Lipid von 0,3:1 beobachtet.

[0021] **Fig. 7A**–B zeigt das pharmakokinetische Verhalten von zwei Formulierungen von liposomalem Topotecan mit unterschiedlichen Verhältnissen von Arzneimittel:Lipid. Element A zeigt, dass eine wesentlich langsamere Arzneimittelfreisetzungsrates beobachtet wird, wenn Topotecan in einem Verhältnis von Arzneimittel:Lipid von 0,11:1 zugeführt wird, was im Vergleich zu Element B, das eine Formulierung mit einem niedrigeren Verhältnis von Arzneimittel:Lipid von 0,02:1 hat, zu einer viel langsameren Rate der Plasmaclearance führt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung und bevorzugter Ausführungsformen

[0022] Die Aktivität vieler Arzneimittel gegen Krebs hängt von ihrem pharmakokinetischen Verhalten ab. Dieses pharmakokinetische Verhalten bestimmt die Arzneimittelkonzentrationen und die Zeitdauer, über die Krebszellen dem Arzneimittel ausgesetzt sind. Im Fall der meisten Arzneimittel gegen Krebs werden längere Expositionszeiten bevorzugt, weil dies zu einem vermehrten Abtöten der Krebszellen führt. Im Allgemeinen werden mehrere Parameter verwendet, um die Pharmakokinetik eines Arzneimittels zu beschreiben. Die Halbwertszeit der Plasmaclearance und die Fläche unter der Kurve („area under the curve“, AUC) sind Beispiele. Die Halbwertszeit der Plasmaclearance ist die Zeit, die benötigt wird, damit die Hälfte des verabreichten Arzneimittels aus dem Plasma entfernt wird. Die AUC ist ein Maß für die Plasmaspiegel des Arzneimittels über die Zeit und bietet eine Anzeige der gesamten Arzneimittlexposition. In Allgemeinen korrelieren eine erhöhte Halbwertszeit der Plasmaclearance und Plasma AUC eines Arzneimittels gegen Krebs mit einer erhöhten therapeutischen Wirksamkeit.

I. Modulieren der Wirkstofffreisetzung

[0023] Die vorliegende Erfindung beschreibt Einsatzmöglichkeiten und Formulierungen zum Modulieren der Arzneimittelfreisetzung aus Liposomen. In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Modulieren der Halbwertszeit der Zirkulation eines Arzneimittels im Plasma bereit, umfassend: (a) das Bereitstellen eines Liposoms, das darin verkapselt freien Wirkstoff und präzipitierten Wirkstoff hat und (b) das Ändern der Menge des im Liposom präzipitierten Wirkstoffs. Bevorzugterweise handelt es sich beim „freien Wirkstoff“ und beim „präzipitierten Wirkstoff“ um denselben Wirkstoff; die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht so eingeschränkt. Wie hier verwendet kann der Begriff „modulieren“ entweder ein Erhöhen oder ein Vermin-

dem der Freisetzungsrates des Wirkstoffs aus dem liposomalen Träger bedeuten. Für antineoplastische Wirkstoffe bedeutet modulieren vorzugsweise ein Vermindern oder Verlangsamen der Freisetzungsrates des Wirkstoffs.

[0024] In bevorzugten Aspekten enthalten die Liposomen der vorliegenden Erfindung sowohl freien Wirkstoff als auch präzipitierten Wirkstoff verkapselt. Die Menge des Wirkstoffs, der innerhalb des Liposoms präzipitiert ist, kann unter Verwendung einer Reihe von Mechanismen variiert werden. Zum Beispiel kann durch Variieren des Verhältnisses von Wirkstoff zu Lipid die Menge des Wirkstoffs, die präzipitiert ist, gesteigert oder gesenkt werden. Das Beladen mit Arzneimitteln bei niedrigen Verhältnissen von Arzneimittel:Lipid führt zu geringen Wirkstoffkonzentrationen (z.B. von Topotecan) im Inneren des Liposoms und daher liegt der größte Teil, wenn nicht die Gesamtheit des gesamten Arzneimittels in Lösung, d.h. nicht präzipitiert oder frei, vor. Geringe präzipitierte Mengen führen zu einer schnellen Freisetzungsrates des Arzneimittels aus dem Liposom. Umgekehrt führt ein hohes Verhältnis von Arzneimittel:Lipid zu hohen intraliposomalen Konzentrationen und zu hohen präzipitierten Mengen. Wenn das Arzneimittel in präzipitierter Form vorliegt, sind die folgenden Freisetzungsrates in vivo oder in vitro langsam. Für antineoplastische Arzneimittel (z.B. Topotecan) sind langsame Freisetzungsrates vorzuziehen.

[0025] Ohne an irgendeine bestimmte Theorie gebunden zu sein wird angenommen, dass die Liposomen der vorliegenden Erfindung einem „Präzipitations-Auflösungs-Mechanismus“ (PDM), der die Arzneimittelfreisetzung bestimmt, unterliegen. Im PDM-Mechanismus der vorliegenden Erfindung ist die Rate der Auflösung des präzipitierten Wirkstoffs (z.B. Topotecan) im Inneren des Liposoms in die im Inneren des Liposoms befindliche Lösung hinein langsam im Vergleich mit der Rate der Freisetzung des Wirkstoffs aus dem Liposom in den Außenraum hinaus und bestimmt so die Rate. Das heißt, die Rate der Auflösung des präzipitierten Wirkstoffs in freies Arzneimittel im Inneren des Liposoms bestimmt, wie schnell das Arzneimittel in das Plasma freigesetzt werden wird.

[0026] In bestimmten Ausführungsformen kann das Verhältnis des Wirkstoffs zu Lipid durch die Zugabe von leeren Liposomen variiert werden. Im Allgemeinen werden Liposomen, ob sie leer sind oder Wirkstoffe enthalten, von Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) abgeräumt. Üblicherweise wird das RES 80–95% einer injizierten Liposomendosis innerhalb einer Stunde entfernen und somit die für die Aufnahme der Liposomen ausgewählte Ziellokalisation gewissermaßen verdrängen. Es wurde über eine Reihe von Faktoren, welche die Rate der Aufnahme von Liposomen durch das RES beeinflussen, berichtet, einschließlich Liposomengröße, Ladung, Ausmaß der Fettsättigung und Oberflächenkomponenten. Indem leere Liposomvesikel aufgenommen werden, ist es möglich, die Liposomen, die Wirkstoff enthalten, vom RES abzuschirmen. Somit verlängern leere Liposomen tatsächlich die Überlebenszeit der Liposomen in der Blutzirkulation, indem sie als „Köder“ wirken. Eine verlängerte Zirkulationszeit ist oft für die Liposomen erforderlich, um die Zielregion, -zelle oder -lokalisation vom Ort der Injektion aus zu erreichen. Die leeren liposomalen Vesikel beschäftigen das RES und als Resultat wird die Serumhalbwertszeit von den Liposomen, die Wirkstoff enthalten, verlängert.

[0027] In bestimmten anderen Aspekten wird (werden) (eine) Verbindung(en), welche die Präzipitation des Wirkstoffs fördern wird (werden), dem Liposom zugeben. In dieser Hinsicht kann eine Reihe geladener Ionen verwendet werden, um die Menge von präzipitiertem Wirkstoff im Inneren des Vesikels zu steigern. In bevorzugten Aspekten werden divalente, trivalente oder polyvalente Anionen verwendet. Geeignete Anionen umfassen, aber sind nicht beschränkt auf Carboxylat ($-\text{CO}_2^-$), Sulfonat (SO_3^-), Sulfat (SO_4^{2-}), Hydroxid ($-\text{OH}$), Alkoxide, Phosphat ($-\text{PO}_4^{2-}$), und Phosphonat ($-\text{PO}_3^{2-}$). Fachleute werden von anderen Verbindungen wissen, welche die Menge von präzipitiertem Wirkstoff im Inneren des Liposoms steigern werden.

[0028] Darüber hinaus können die Verhältnisse von Arzneimittel:Lipid unter Verwendung der Liposomengröße variiert werden. Je größer das verwendete Liposomvesikel ist, desto kleiner ist das Verhältnis von Arzneimittel:Lipid. In bestimmten Aspekten werden sowohl das Verhältnis von Wirkstoff zu Lipid als auch die Größe der Liposomen variiert, um die Wirksamkeit des Wirkstoffs zu optimieren.

[0029] Die Menge des verkapselten Wirkstoffs, der im Vesikel präzipitiert ist, wird variieren und ist einigermaßen vom Wirkstoff selbst abhängig. In bestimmten Ausführungsformen beträgt die Menge des präzipitierten Wirkstoffs mindestens etwa 25% bis etwa 95% (wie zum Beispiel etwa 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% und 95%) des gesamten Wirkstoffs. Bei Topotecan beträgt die Menge des im Liposom verkapselten präzipitierten Wirkstoffs mindestens 50% des gesamten Wirkstoffs.

[0030] In bevorzugten Aspekten, wenn der Wirkstoff ein antineoplastisches Arzneimittel ist, führt das Verwenden höherer Verhältnisse von Arzneimittel:Lipid zu höheren Mengen des verkapselten, präzipitierten Arznei-

mittels. Als Ergebnis ist die Arzneimittelfreisetzung aus den Liposomen in vivo langsamer als für ähnliche Zusammensetzungen, die bei einem niedrigeren Verhältnis von Arzneimittel:Lipid zubereitet wurden. Diese Liposomen mit einem höheren Verhältnis von Arzneimittel:Lipid zeigen eine verlängerte Plasma-Halbwertszeit und erhöhte Werte für die Plasma-AUC. Vorteilhafterweise zeigen diese Formulierungen eine erhöhte Wirksamkeit gegen Tumore.

[0031] In bestimmten Ausführungsformen beträgt das Verhältnis von Wirkstoff:Lipid etwa 0,005–1:1 (Gewicht/Gewicht).

[0032] Vorzugsweise beträgt das Verhältnis von Wirkstoff:Lipid etwa 0,05–0,9:1 (Gewicht/Gewicht) und bevorzugter beträgt das Verhältnis von Wirkstoff:Lipid etwa 0,1–0,5:1 (Gewicht/Gewicht). Durch Modulieren der Halbwertszeit der Plasmazirkulation des Wirkstoffs ist es somit möglich, die Wirksamkeit des Wirkstoffs zu maximieren oder optimieren.

II. Zusammensetzungen und Verfahren zum Herstellen liposomaler Formulierungen

[0033] Liposom, Vesikel und Liposomvesikel sind so zu verstehen, dass sie Strukturen bezeichnen, die lipidhaltige Membranen haben, welche einen wässrigen Innenraum umschließen. Die Strukturen können, wenn nicht anders angegeben, eine oder mehrere Lipidmembranen haben, obwohl im Allgemeinen die Liposomen nur eine Membran haben. Solche Liposomen mit einer Schicht werden hier als „unilamellar“ bezeichnet. Liposomen mit mehreren Schichten werden hier als „multilamellar“ bezeichnet.

[0034] Die Liposomen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, werden vorzugsweise aus Lipiden, die, wenn sie verbunden sind, relativ stabile Vesikel bilden, gebildet. Im Fachgebiet ist eine enorme Vielzahl von Lipiden, die zum Erzeugen solcher Liposomen verwendet werden können, bekannt. Bevorzugte Lipide schließen neutrale und negativ geladene Phospholipide oder Sphingolipide und Sterine wie zum Beispiel Cholesterin ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Die Auswahl der Lipide richtet sich im Allgemeinen nach Gesichtspunkten z.B. der Liposomengröße und der Stabilität der Liposomen im Blutstrom.

[0035] Bevorzugte Liposomzusammensetzungen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung beinhalten solche, die Sphingomyelin und Cholesterin umfassen. Das Verhältnis von Sphingomyelin zu Cholesterin in der Liposomzusammensetzung kann variieren, liegt aber im Allgemeinen im Bereich von etwa 75/25 mol%/mol% Sphingomyelin/Cholesterin bis etwa 30/50 mol%/mol% Sphingomyelin/Cholesterin, bevorzugter von etwa 70/30 mol%/mol% Sphingomyelin/Cholesterin bis etwa 40/45 mol%/mol% Sphingomyelin/Cholesterin und noch bevorzugter bei etwa 55/45 mol%/mol% Sphingomyelin/Cholesterin. Es können nach Notwendigkeit andere Lipide in die Liposomzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung einbezogen werden, wie zum Beispiel zum Verhindern von Lipidoxidation oder zum Anlagern von Liganden auf die Oberfläche der Liposomen. Im Allgemeinen wird, wenn Lipide einbezogen werden, die weitere Einlagerung solcher Lipide zu einer Abnahme des Verhältnisses Sphingomyelin/Cholesterin führen. Liposomen dieser Art sind als Sphingosomen bekannt und in U.S. Patent Nr. 5.814.335 ausführlicher beschrieben.

[0036] Es ist eine Reihe von Verfahren zum Zubereiten von Liposomen verfügbar, wie z.B. beschrieben in Szoka, et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), U.S. Patente Nr. 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, im Text Liposomes, Marc J. Ostro, Herausgeber, Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, Kapitel 1 und Hope, et al., Chem. Phys. Lip. 40: 89 (1986). Das Protokoll zum Erzeugen von Liposomen beinhaltet im Allgemeinen: Mischen der Lipidkomponenten in einem organischen Lösungsmittel, Trocknen und Rekonstituieren der Liposomen in wässrigem Lösungsmittel und Festlegen der Größe der Liposomen (wie zum Beispiel durch Extrusion); all dies ist im Fachgebiet gut bekannt.

[0037] Es sind auch alternative Verfahren zum Zubereiten von Liposomen verfügbar. Zum Beispiel wird ein Verfahren, das ein auf Detergentsdialyse basierendes selbstständiges Zusammenfügen von Lipidpartikeln umfasst, in dem an Wheeler et al. erteilten U.S. Patent Nr. 5.976.567, das die zeitraubenden und schwer zu skalierenden Schritte des Trocknens und Rekonstituierens vermeidet, offenbart und beansprucht. Weitere Verfahren zum Zubereiten von Liposomen unter Verwendung von Hydratation bei kontinuierlichem Fluss sind in der Entwicklung und können oft den leistungsfähigsten Ablauf für die Massenfertigung bieten.

[0038] Die Zubereitung von liposomalen Formulierungen, die über Wirkstoffe (z.B. Camptothecine) verfügen, erfordert das Verpacken des Arzneimittels in die Liposomen. Das Beladen kann entweder passiv oder aktiv erfolgen. Passives Beladen erfordert im Allgemeinen, dass das Arzneimittel zum Zeitpunkt des Rekonstitutionsschrittes dem Puffer zugegeben wird. Dies ermöglicht, dass das Arzneimittel im Inneren des Liposoms ein-

geschlossen wird, wo es verbleiben wird, wenn es nicht fettlöslich ist und wenn das Vesikel intakt bleibt (solche Verfahren werden zum Beispiel in der PCT Publikation Nr. WO 95/08986 angewandt).

[0039] Aktives Beladen ist in vieler Hinsicht vorzuziehen und eine Vielzahl therapeutischer Wirkstoffe kann mit einer Effizienz der Verkapselung von nahezu 100% in Liposomen geladen werden, indem ein transmembranöser pH- oder Ionengradient verwendet wird (siehe Mayer, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1025: 143–151 (1990) und Madden, et al., *Chem. Phys. Lipids* 53: 37–46 (1990)). Fachleuten sind zahlreiche Verfahren des aktiven Beladens bekannt. Alle diese Verfahren umfassen den Aufbau einer Art von Gradienten, der lipophile Verbindungen in das Innere der Liposomen zieht, wo sie so lange bleiben können, wie der Gradient aufrecht erhalten wird. Es können sehr große Mengen des gewünschten Arzneimittels im Inneren erreicht werden, soviel, dass das Arzneimittel im Inneren ausfallen und einen weiterbestehenden Aufnahmegradien erzeugen kann.

[0040] Für die Verwendung mit der vorliegenden Erfindung wird ein von Ionophoren vermitteltes Beladen, wie es in U.S. Patent Nr. 5.837.282 offenbart und beansprucht wird, besonders bevorzugt. Das von Ionophoren vermittelte Beladen ist ein elektrisch neutraler Prozess und führt nicht zur Bildung eines Transmembranpotenzials. Zum Transport von Wasserstoffionen in das Vesikel hinein gibt es einen begleitenden Transport von Magnesiumionen aus dem Vesikel heraus in einem Verhältnis von 2:1 (d.h. kein Nettoladungstransfer). Im Fall von Topotecan nimmt man an, dass der Wirkstoff die Membran in neutralem Zustand (keine Ladung) passiert. Mit dem Eintritt in das Vesikel wird Topotecan positiv geladen. Da das von Ionophoren vermittelte Beladen ein elektrisch neutraler Prozess ist, wird kein Transmembranpotenzial erzeugt.

[0041] Eine für pharmazeutische Zwecke wichtige Eigenschaft liposomaler Camptothecine ist das Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid in der endgültigen Formulierung. Wie früher erörtert können Arzneimittel:Lipid-Verhältnisse auf zwei Arten festgelegt werden: 1) unter Verwendung homogener Liposomen, von denen jedes dasselbe Verhältnis Arzneimittel:Lipid hat oder 2) durch Mischen von leeren Liposomen mit Liposomen, die ein hohes Arzneimittel:Lipid-Verhältnis haben, um für ein geeignetes Durchschnittsverhältnis Arzneimittel:Lipid zu sorgen. Für unterschiedliche Anwendungen können unterschiedliche Arzneimittel:Lipid-Verhältnisse gewünscht sein. Technische Verfahren zum Erzeugen bestimmter Arzneimittel:Lipid-Verhältnisse sind im Fachgebiet gut bekannt. Arzneimittel:Lipid-Verhältnisse können auf einer Basis Gewicht zu Gewicht, auf einer Basis Mol zu Mol oder jeder anderen gewünschten Basis gemessen werden. Bevorzugte Arzneimittel:Lipid-Verhältnisse reichen von etwa 0,005:1 Arzneimittel:Lipid (nach Gewicht) bis etwa 0,2:1 Arzneimittel:Lipid (nach Gewicht) und bevorzugter von etwa 0,1:1 Arzneimittel:Lipid (nach Gewicht) bis etwa 0,3:1 Arzneimittel:Lipid (nach Gewicht).

[0042] Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Größe der Liposom-Partikel. Zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung werden Liposomen mit einer Größe von etwa 0,05 Mikron bis etwa 0,15 Mikron bevorzugt.

[0043] Die vorliegende Erfindung stellt auch liposomale Zusammensetzungen (z.B. Camptothecin) in Form eines Kits bereit. Der Kit kann eine gebrauchsfertige Formulierung oder eine Formulierung, die ein Mischen des Medikaments vor der Verabreichung erfordert, umfassen. Der Kit wird typischerweise einen Behälter, der zur Aufnahme der verschiedenen Elemente des Kits unterteilt ist, umfassen. Der Kit wird die liposomalen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung oder die Komponenten davon, möglicherweise in dehydratisierter Form, mit einer Anleitung zu ihrer Rehydratisierung und Verabreichung enthalten.

[0044] Die Liposom-Zusammensetzungen, die zum Beispiel mit den hier beschriebenen Verfahren zubereitet wurden, können entweder allein oder in einer Mischung mit einem physiologisch akzeptablen Träger (wie zum Beispiel physiologischer Kochsalzlösung oder Phosphatpuffer), der in Übereinstimmung mit der Art der Verabreichung und mit pharmazeutischem Standardvorgehen ausgewählt wird, verabreicht werden. Im Allgemeinen wird normale Kochsalzlösung als pharmazeutisch akzeptabler Träger verwendet werden. Andere geeignete Träger schließen z.B. Wasser, gepuffertes Wasser, 0,4% Kochsalzlösung, 0,3% Glycin und Ähnliches ein, einschließlich Glycoproteine für eine verbesserte Stabilität wie zum Beispiel Albumin, Lipoprotein, Globulin etc. Diese Zusammensetzungen können mit konventionellen, gut bekannten Sterilisationsverfahren sterilisiert werden. Die resultierenden wässrigen Lösungen können zur Verwendung abgepackt oder unter aseptischen Bedingungen gefiltert und lyophilisiert werden, wobei die lyophilisierte Zubereitung vor der Verabreichung mit einer sterilen wässrigen Lösung kombiniert wird. Die Zusammensetzungen können auch zur Annäherung an physiologische Bedingungen nach Bedarf pharmazeutisch akzeptable Hilfsstoffe enthalten wie zum Beispiel Wirkstoffe, die den pH-Wert einstellen und puffern, Wirkstoffe, welche die Tonizität regulieren, und Ähnliches, zum Beispiel Natriumacetat, Natriumlactat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid etc. Zusätzlich kann die Zusammensetzung lipidschützende Wirkstoffe, die Lipide gegen Schädigungen durch freie Radikale und

Lipid-Peroxidasen während der Lagerung schützen, enthalten. Lipophile Quencher für freie Radikale wie zum Beispiel α -Tocopherol und wasserlösliche eisenspezifische Chelatbildner wie zum Beispiel Ferrioxamin sind geeignet.

[0045] Eine Vielzahl von Wirkstoffen ist für die liposomalen Zusammensetzungen und die Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet. In einem bevorzugten Aspekt sind die Wirkstoffe antineoplastische Arzneimittel. Gegenwärtig gibt es etwa zwanzig anerkannte Klassen von zugelassenen antineoplastischen Arzneimitteln. Die Klassifizierungen sind Verallgemeinerungen, die entweder auf einer gemeinsamen Struktur, die von den einzelnen Arzneimitteln geteilt wird, oder auf einem gemeinsamen Wirkmechanismus der Arzneimittel beruhen. Eine unvollständige Liste einiger der allgemein bekannten, kommerziell zugelassenen (oder in der aktiven Entwicklung befindlichen) antineoplastischen Wirkstoffe lautet wie folgt:

Strukturbasierte Klassen:

1. Fluorpyrimidine — 5-FU, Fluordesoxyuridin, Ftorafur, 5'-Desoxyfluoruridin, UFT, S-1 Capecitabin;
2. Pyrimidinnukleoside — Desoxycytidin, Cytosinarabinosid, 5'-Azacytosin, Gemcitabin, 5'-Azacytosinabinosid;
3. Purine — 6-Mercaptopurin, Thioguanin, Azathioprin, Allopurinol, Cladribin, Fludarabin, Pentostatin, 2-Chloradenosin;
4. Platinanaloga — Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin, Tetraplatin, Platin-DACH, Ormaplatin, CI-973, JM-216;
5. Anthracycline/Anthracendione — Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantron;
6. Epipodophyllotoxine — Etoposid, Teniposid;
7. Camptothecine — Irinotecan, Topotecan, 9-Aminocamptothecin, 10,11-Methylenedioxcamptothecin, 9-Nitrocamptothecin, TAS 103, 7-(4-Methylpiperazinomethylen)-10,11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin, 7-(2-N-Isopropylamino)ethyl)-20(S)-camptothecin;
8. Hormone und Hormonanaloga — Diethylstilbestrol, Tamoxifen, Toremifen, Tamoxifen, Tomudex, Thymitaq, Flutamid, Bicalutamid, Finasterid, Estradiol, Trioxifen, Droloxifen, Medroxyprogesteronacetat, Megesterolacetat, Aminoglutethimid, Testolacton und andere;
9. Enzyme, Proteine und Antikörper — Asparaginase, Interleukine, Interferone, Leuprolid, Pegaspargase und andere;
10. Vincaalkaloide — Vincristin, Vinblastin, Vinorelbin, Vindesin;
11. Taxane — Paclitaxel, Docetaxel.

Mechanismusbasierte Klassen:

1. Antihormone — siehe Klassifizierung für Hormone und Hormonanaloga, Anastrozol;
2. Antifolate — Methotrexat, Aminopterin, Trimetrexat, Trimethoprim, Piritrexim, Pyrimethamin, Edatrexat, MDAM;
3. Antimikrotubuläre Wirkstoffe — Taxane und Vincaalkaloide;
4. Alkylierende Wirkstoffe (klassisch und nicht klassisch) — Stickstofflost, (Mechlorethamin, Chlorambucil, Melphalan, Uracilmustard), Oxazaphosphorine (Ifosfamid, Cyclophosphamid, Perfosfamid, Trophosphamid), Alkylsulfonate (Busulfan), Nitrosoharnstoffe (Carmustin, Lomustin, Streptozocin), Thiotepa, Dacarbazin und andere;
5. Antimetaboliten — Purine, Pyrimidine und Nukleoside, oben aufgelistet;
6. Antibiotika — Anthracycline/Anthracendione, Bleomycin, Dactinomycin, Mitomycin, Plicamycin, Pentostatin, Streptozocin;
7. Topoisomerasehemmer — Camptothecine (Topo I) Epipodophyllotoxine, m-AMSA, Ellipticine (Topo II);
8. Antivirenmittel — AZT, Zalcitabin, Gemcitabin, Didanosin und andere;
9. verschiedene zytotoxische Wirkstoffe — Hydroxyharnstoff, Mitotan, Fusionstoxine, PZA, Bryostatin, Retinoide, Buttersäure und Derivate, Pentosan, Fumagillin und andere.

[0046] Es ist die Aufgabe von allen antineoplastischen Arzneimitteln, Krebszellen zu eliminieren (Heilung) oder ihr Wachstum und ihre Ausbreitung zu verzögern (Remission). Die Mehrzahl der oben aufgelisteten antineoplastischen Wirkstoffe gehen dieser Aufgabe nach, indem sie eine primäre zytotoxische Aktivität besitzen, was ein direktes Abtöten der Krebszellen bewirkt. Andere antineoplastische Arzneimittel stimulieren das natürliche Immunsystem des Körpers, um ein Abtöten der Krebszellen zu bewirken. Die Literatur ist mit Diskussionen über die Aktivität und Mechanismen aller obigen und vieler anderer Medikamente übersättigt.

[0047] Beispielhafte Verfahren zum Herstellen bestimmter Formulierungen liposomaler Camptothecine und

besonders von liposomalem Topotecan werden unten in den Beispielen dargelegt.

III. Verfahren zum Verwenden von liposomalen Camptothecinen

[0048] Die liposomalen Zusammensetzungen (z.B. Camptothecin) dieser Erfindung werden bei der Behandlung solider Tumoren in einem Tier wie zum Beispiel einem Menschen verwendet. Die Beispiele unten legen Schlüsselparameter der Arzneimittel:Lipid-Verhältnisse, der zu verabreichenden Dosierungen von Wirkstoff und Lipid und der bevorzugten Dosierungsschemata zum Behandeln der unterschiedlichen Tumorarten dar.

[0049] Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen parenteral verabreicht, d.h. intra-artikulär, intravenös, intraperitoneal, subcutan oder intramuskulär. Bevorzugter werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen durch eine intravenöse Infusion oder intraperitoneal durch eine Bolusinjektion verabreicht. Die Konzentration der Liposomen in den pharmazeutischen Formulierungen kann in einem weiten Bereich variieren, d.h. von weniger als etwa 0,05%, üblicherweise bei oder mindestens etwa 2–5% bis hin zu 10 bis 30% nach Gewicht, und wird in erster Linie nach Flüssigkeitsvolumina, Viskositäten etc. in Übereinstimmung mit der ausgewählten bestimmten Art der Verabreichung ausgewählt werden. Zum Beispiel kann die Konzentration erhöht werden, um die mit der Behandlung verbundene Belastung mit Flüssigkeit zu vermindern. Alternativ können aus reizenden Lipiden bestehende Liposomen auf niedrige Konzentrationen verdünnt werden, um Entzündungen an den Stellen der Verabreichung abzuschwächen. Die Menge der verabreichten Liposomen wird vom jeweiligen verwendeten Camptothecin, vom behandelten Krankheitsstadium und von der Beurteilung des Klinikers abhängen, wird aber im Allgemeinen beim Menschen zwischen etwa 0,01 und etwa 50 mg pro Kilogramm Körpergewicht betragen, vorzugsweise zwischen etwa 5 und etwa 40 mg/kg Körpergewicht. Für Mäuse sind höhere Lipiddosierungen geeignet, zum Beispiel 50–120 mg/kg.

[0050] Die Dosierung des Wirkstoffs (z.B. von Camptothecin) wird von der Ansicht des verabreichenden Arztes, die auf dem Alter, dem Gewicht und dem Zustand des Patienten beruht, und vom Behandlungsplan abhängen. Eine empfohlene Dosierung für freies Topotecan beim kleinzelligen Bronchialkarzinom beträgt 1,5 mg/m² pro Dosis, täglich über 5 Tage, alle drei Wochen wiederholt. Aufgrund der Verbesserungen bei der Behandlung, die jetzt in den Beispielen unten gezeigt werden, werden Dosen des Arzneimittels (z.B. Topotecan) bei Menschen abhängig vom Dosierungsplan in so niedrigen Bereichen wie von 0,015 mg/m²/Dosis an wirksam sein und werden noch bei so hohen Dosierungen wie 15 bis 75 mg/m²/Dosis verträglich sein. Die Dosen können Einzeldosierungen sein oder können wiederholt alle 4 h, 6 h oder 12 h oder jeden Tag, jeden 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9. 10. Tag oder als Kombination davon verabreicht werden. Ein bevorzugter Plan kann einen Behandlungszyklus verwenden, der jede Woche, alle zwei Wochen, drei Wochen, vier Wochen, fünf Wochen oder sechs Wochen oder als Kombination davon wiederholt wird. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform wird die Behandlung einmal pro Woche mit einer Dosierung, die üblicherweise weniger als 1,5 mg/m² beträgt, verabreicht.

[0051] Besonders bevorzugte Dosierungen und Therapiepläne für Topotecan sind wie folgt:

Dosierung (mg/m ² /Dosis)	Dauer	Wiederholung des Zyklus alle:
0,15	1dx5d	3 Wochen
0,5	1d	1 Woche
1,5	1d	1 Woche
15	1d	3 Wochen
50	1d	3 Wochen

[0052] Die Erfindung wird durch spezielle Beispiele ausführlicher beschrieben werden. Die folgenden Beispiele werden zu Zwecken der Veranschaulichung angeführt und sollen die Erfindung in keiner Weise limitieren. Fachleute werden leicht eine Reihe von nicht kritischen Parametern, die geändert oder modifiziert werden können, um im Wesentlichen dasselbe Ergebnis zu erhalten, erkennen.

IV. Beispiele

A. Materialien und Methoden

1. Materialien. Topotecan (Hycamtin™, SmithKline Beecham) wurde von der Apotheke bei der British Columbia Cancer Agency gekauft. Sphingomyelin (SM) wurde von Avanti Polar Lipids erworben. Sphingomyelin von Northern Lipids wurde in einer frühen Untersuchung verwendet, war aber in Ethanol geringer löslich als die Ausführung von Avanti. Cholesterin (CH) und das divalente Kationen-Ionophor A23187 wurden von Sigma erworben. Als Lipidmarker wurde [³H]-Cholesterylhexadecylether (Dupont) verwendet.
2. Mäuse. Weibliche ICR, BDF-1 oder thymuslose nu/nu (6–8 Wochen) Mäuse wurden von Harlan-Sprague Dawley (Indianapolis, IN) gekauft. Alle Tiere wurden für eine Woche vor ihrer Verwendung in Quarantäne gehalten. Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den vom Canadian Council on Animal Care (CCAC) und vom Institutional Animal Care and User Committee (IACUC) aufgestellten Leitlinien durchgeführt.
3. Formulierung von Topotecan mit dem Mg-A23187-Verfahren. Topotecan wurde in SM:CH (55:45, mol/mol) Liposomen unter Verwendung des Mg-A23187-Ionophor-Verfahrens gemäß U.S. Patent Nr. 5.837.282 verkapselt. Das anfängliche Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid betrug 0,10 (Gewicht/Gewicht) und die Beladung mit Arzneimittel lag üblicherweise bei 95–100%. Der externe Puffer bestand aus 10 mM PBS, pH 7,5 und 300 mM Saccharose. Alle Formulierungen wurden im Hinblick auf Partikelgröße, Effizienz der Beladung mit Arzneimittel, pH und Konzentration von Arzneimittel und Lipid untersucht.
4. Arzneimitt Zubereitung und Dosierung. Jedes Gefäß mit Topotecan (Hycamtin™) wurde in 1,0 ml sterilem Wasser hydratisiert, was eine Topotecan-Konzentration von 4,0 mg/ml ergab. Nachfolgende Verdünnungen wurden in 0,9% steriler Kochsalzlösung vorgenommen, um den niedrigen pH-Wert, der für die Lactonform des Arzneimittels erforderlich ist, aufrechtzuerhalten. Nicht verwendetes Arzneimittel in der wässrigen Stammlösung (4,0 mg/ml) wurde bei 4°C unter Lichtabschluss aufbewahrt. In Liposomen verkapseltes Topotecan wurde in 0,9% Kochsalzlösung auf die für die Verabreichung erforderliche Konzentration verdünnt. Alle Verabreichungen des Arzneimittels erfolgten mit 10 ml/kg (200 µl/20 g Maus) über die laterale Schwanzvene.
5. Pharmakokinetik und Untersuchungen des Verlusts in vivo. Die Pharmakokinetik und der Arzneimittelverlust von freiem und in Liposomen verkapseltem Topotecan wurden in ICR Mäusen über 24 Stunden nach der intravenösen Verabreichung über die laterale Schwanzvene ausgewertet. Zwei unterschiedliche Verhältnisse von Arzneimittel zu Lipid, d.h. 0,10 (Gewicht/Gewicht) und 0,02 (Gewicht/Gewicht) wurden verwendet, um den Einfluss des Verhältnisses von Arzneimittel zu Lipid und der Lipiddosis auf den Arzneimittelverlust und das PK-Verhalten zu untersuchen. Verkapseltes Topotecan wurde mit 1 mg/kg (10 oder 50 mg/kg Lipid) und mit 5 mg/kg Topotecan (50 mg/kg Lipid) verabreicht. Dementsprechend wurde das PK-Verhalten von freiem Topotecan bei 1 und 5 mg/kg ausgewertet. Gesamt-Topotecan im Blut wurde mit einem Fluoreszenztest, dem eine Fällung von Plasmaproteinen vorausging, bestimmt. Topotecan wurde mit Spektrofluorimetrie bei einer Exzitationswellenlänge (2,5 nm Spaltbreite) und einer Emissionswellenlänge (2,5 nm Spaltbreite) von 380 beziehungsweise 518 nm quantifiziert. Die Lipidspiegel im Plasma wurden mit Flüssigkeitsszintillationszählung des [³H]-CNE-Markers bestimmt.
6. MTD Untersuchungen. Untersuchungen der MTD (maximal tolerierte Dosis) wurden in dem Maus-Wirtstamm, der jedem Tumormodell entsprach, durchgeführt. Untersuchungen der MTD wurden für Einzeldosen und mehrfache Dosierungen durchgeführt, indem der Gewichtsverlust über die Zeit überwacht wurde. Die MTD wurde als die Dosis definiert, welche zu einem Gewichtsverlust von 20% führte.
7. Untersuchungen zur Myelosuppression und Neutropenie. Änderungen des peripheren Blutbildes als Konsequenz der Verabreichung von Topotecan wurden über 4–6 Wochen in ICR Mäusen verfolgt. An den Tagen 1, 3, 5, 7, 14 und 21 nach der intravenösen Verabreichung von freiem oder in Liposomen verkapseltem Topotecan mit 10 mg/kg wurde Blut in EDTA-Microtainer-Röhrchen abgenommen. Als Kontrolle wurde leere Vesikel verabreicht. Untersuchungen des Blutstatus und der Differenzialblutbilder wurden an den Central Labs for Veterinarians (Langley, BC) vorgenommen, um die Spiegel, Verhältnisse und Morphologie der Zellen zu quantifizieren.
8. Tumormodelle. Das L1210 Maus-Leukämie-Modell und das CT-26 Maus-Kolonmetastasen-Modell wurden wie in den Standardprotokollen verwendet. MX-1 und LX-1 Zelllinien vom Menschen wurden vom DCTD Tumor Repository in Frederick, MD, bezogen. Diese Zelllinien wurden als Tumorfragmente in Empfang genommen und wurden durch fortlaufende Transplantationen von Fragmenten von 3 × 3 mm in NCr nackte Mäuse propagiert. Die Experimente wurden nicht aufgenommen, bevor die Zelllinien 3 Durchläufe in nackten Mäusen absolviert hatten und die Tumorkolonien wurden neu initiiert, wenn die Zahl der Durchläufe 10 erreicht hatte.
9. Studien zur Wirksamkeit. Alle Dosen von freiem und liposomalen Topotecan wurden intravenös mit 10 ml/kg über die laterale Schwanzvene verabreicht. In den L1210 und CT-26 Modellen wurde die Dosis am

Tag 1 (Injektion der Tumorzellen = Tag 0) gegeben. Bei den MX-1 und LX-1 Tumormodellen wurde das Volumen der Tumore durch wiederholte rechtwinkelige Messungen der Tumorabmessungen und unter Verwendung der Formel:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = (L \times W^2)/2$$

bestimmt.

[0053] Bei den MX-1 und LX-1 Modellen wurde mit der Dosierung begonnen, wenn die Tumore klar Wachstum gezeigt hatten und im Größenbereich 100–300 mm³ waren.

[0054] Da die meisten Arzneimittel ein Gleichgewicht zwischen biologischer Wirkung und Toxizität zeigen, ist es nützlich, einen Parameter, der beide dieser Attribute einbezieht, zu untersuchen. Der am häufigsten verwendete Parameter ist die therapeutische Breite (TI). Herkömmlich ist die therapeutische Breite definiert als:

$$TI = LD_{50}/ED_{50}$$

[0055] Da es jedoch nicht länger zulässig ist, Untersuchungen der LD₅₀ durchzuführen, wurde die therapeutische Breite für diese Untersuchungen wie folgt definiert:

$$TI = MTD/MED.$$

[0056] In der obigen Formel ist MTD die maximal tolerierte Dosis, definiert als die Dosis, die in einer Gruppe von Tieren einen durchschnittlichen Gewichtsverlust von 20% verursacht, und MED ist die minimale wirksame Dosis, definiert als die Dosis, die ein optimales % T/C von ≤ 40 in den Modellen mit soliden Tumoren oder eine % ILS von $50 \pm 10\%$ in den Überlebensmodellen ergibt.

B. Ergebnisse

1. Pharmakokinetik und Arzneimittelverlust. Der Einfluss der Verkapselung in Liposomen und des Verhältnisses von Arzneimittel zu Lipid auf die Pharmakokinetik im Plasma und auf den Arzneimittelverlust von Topotecan wurde über 24 Stunden an ICR Mäusen untersucht. Die Verkapselung von Topotecan in Liposomen (Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid 0,11, Gewicht/Gewicht) hatte einschneidende Auswirkungen auf die pharmakokinetischen Parameter des Arzneimittels (siehe **Fig. 1** oben und Tabelle 1). Bei einer Topotecandosis von 5 mg/kg wurden eine 164-fache Steigerung der Plasma-AUC, eine 24-fache Steigerung der C_{max} und eine 24-fache Steigerung der Plasma- α -Halbwertszeit für das liposomale Arzneimittel im Vergleich zum freien Arzneimittel (siehe Tabelle 1) beobachtet. Historisch haben erhebliche Verbesserungen bei der AUC und den Plasma-Halbwertszeiten von liposomalen Arzneimitteln zu einer verbesserten Abgabe des Arzneimittels an erkrankte Lokalisationen (wie zum Beispiel Tumore) geführt, ein Vorgang, der als „disease-site targeting“ bekannt ist.

Die Formulierungen, die in dieser Untersuchung verwendet wurden, wurden mit dem Mg-A23187 Ionophor-Verfahren zubereitet. Es zeigte sich eine initiale schnelle Freisetzung des Arzneimittels in den ersten 10–30 Minuten nach der intravenösen Verabreichung (siehe **Fig. 1** unten), gefolgt von einer Phase einer allmählicheren Freisetzung. Die t_{1/2Freisetzung} betrugen für die Formulierungen mit Mn-A23187 und Mg-A23187 ~ 3 h beziehungsweise ~ 5–7 h; nach 24 Stunden war jedoch in beiden Formulierungen sehr wenig Arzneimittel vorhanden.

Bei den meisten liposomalen Arzneimittelformulierungen werden die pharmakokinetischen Eigenschaften des verkapselten Arzneimittels von der Lipidzusammensetzung und -dosis kontrolliert. Es zeigte sich, dass liposomales Topotecan auch bei sehr niedrigen Arzneimitteldosierungen (0,5 mg/kg, Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid 0,10, Gewicht/Gewicht) eine außergewöhnliche Aktivität gegen Tumore aufwies. Bei diesen Arzneimitteldosierungen und diesem Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid wird erwartet, dass die Elimination der Liposomen aus dem Plasma rasch erfolgt. Daher wurde eine Topotecanformulierung mit einem niedrigen Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid (0,02, Gewicht/Gewicht) untersucht, um zu ermitteln, ob die Pharmakokinetik von Topotecan bei niedrigen Dosierungen verbessert werden konnte. Interessanterweise setzte in dieser Untersuchung die Formulierung mit dem niedrigen Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid das Arzneimittel viel schneller frei als die Formulierung mit dem höheren Verhältnis von Arzneimittel zu Lipid (0,11, Gewicht/Gewicht). Dieses Ergebnis war unerwartet.

Tabelle 1. Pharmakokinetische Parameter von freiem und liposomalen Topotecan.

Formulierung	Dosis (mg/kg)	AUC (h•µg/ml)	Cmax (µg/ml)	Cl (ml/h)	$\alpha_{1/2}$ (h)	$\beta_{1/2}$ (h)
Frei	1	1,97	0,75	13,9	0,14	11,8
	5	2,77	2,17	49,6	0,26	11,4
TCS	1	65,7	16,3	0,417	2,79	
	5	453	51,0	0,302	6,16	

Alle Parameter stammen aus Ein- oder Zweikompartmentmodellen unter Verwendung der WINNONLIN PK Modellsoftware.

2. Maximal tolerierte Dosen. Es wurden Untersuchungen der MTD für Einzeldosen und mehrfache Dosierungen bei tumortragenden Balb/c, BDF-1 und NCr nu/nu Mäusen durchgeführt. Das Körpergewicht der einzelnen Mäuse wurde während jeder Untersuchung überwacht, um die allgemeine Verträglichkeit von freiem und liposomalem Topotecan zu bewerten und, wenn möglich, eine MTD festzusetzen (siehe Fig. 2). Die maximal tolerierte Dosis von liposomalem Topotecan betrug 10 mg/kg bei einer einzelnen Verabreichung, 7,5 mg/kg bei einem g7d × 3-Plan und 5 mg/kg bei einem g3d × 4-Plan. Die berichtete LD₁₀ für freies Topotecan nach einer einzelnen intravenösen Infusion beträgt bei Mäusen 75 mg/m² (~25 mg/kg) [Hycamtin™ Produktbeschreibung]; es wurde jedoch nur ein sehr geringer Gewichtsverlust bei Dosen bis zu 40 mg/kg beobachtet, obwohl aufgrund akuter Reaktionen dies als die MTD angesehen wurde. Die Arzneimittelmengen waren begrenzt, so dass Dosierungen über 40 mg/kg (verabreicht über 5–10 Minuten) nicht weiter verfolgt wurden. Es wurde früher gezeigt, dass die LD₁₀ für freies Topotecan bei einem gd × 5-Plan 14 mg/m²/Dosis (~4,7 mg/kg/Dosis) beträgt (Grochow, et al., Drug Metab. Dispos. 20: 706–713 (1992)).

3. Toxizität. Die wesentliche dosislimitierende Toxizität von freiem Topotecan, das an 5 aufeinander folgenden Tagen (d × 5) täglich mit 1,5 mg/m²/Dosis, der MTD, an Menschen verabreicht wird, besteht in einer nicht kumulativen Myelosuppression. Wie früher erwähnt sind Menschen empfindlicher als Mäuse gegen Myelosuppression und können nur 11% der MTD in Mäusen (1,5 gegenüber 14 mg/m²) vertragen. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Hunde ein wesentlich besserer Prädiktor der Topotecan-Myelosuppression beim Menschen sind (Burris, et al., J. Natl. Cancer Inst. 84: 1816–1820(1992)). Jedoch sollten Mäuse dazu geeignet sein, die relativen myelosuppressiven Wirkungen von freiem und von in Liposomen verkapseltem Topotecan zu vergleichen.

[0057] In einer Untersuchung trat die maximale Abnahme der peripheren Leukozytenzahl am Tag 3 nach der Injektion nach der Verabreichung von liposomalem Topotecan auf. Es wurde dann ein Vergleich der Spiegel und der Morphologie der peripheren Blutzellen am Tag 3 nach der Verabreichung von freiem oder in Liposomen verkapseltem Topotecan oder von leeren Vesikeln angestellt (siehe Tabelle 2). Die für diesen Vergleich verwendete Dosierung war die MTD für das in Liposomen verkapselte Topotecan (10 mg/kg). Es wurde eine signifikante Reduktion der zirkulierenden Neutrophilen für liposomales Topotecan im Vergleich zu freiem Topotecan (~10-fach), leeren Vesikeln (~10-fach) oder Kontrolltieren (~20-fach) beobachtet. Die gesamten Leukozytenzahlen und die Subpopulation der Lymphozyten waren bei liposomalem Topotecan im Vergleich zu Kontrolltieren etwa zweifach vermindert. Bei diesen Parametern wurden keine signifikanten Unterschiede für freies Topotecan mit derselben Dosierung beobachtet. Am Tag 21 nach der Injektion blieben die gesamten Leukozytenzahlen für liposomales Topotecan etwa 2,5-fach niedriger als bei normalen Tieren; jedoch hatten sich die Spiegel der Neutrophilen von einer 20-fachen Verminderung auf eine 3-fache Verminderung im Vergleich mit normalen Mäusen erholt. Die Spiegel der Lymphozyten blieben ~2-fach niedriger als bei normalen Mäusen. Es wurden keine anderen signifikanten Unterschiede beobachtet.

[0058] Eine Untersuchung der Serum-Chemie-Parameter am Tag 3 nach der Injektion ergab sehr wenig Änderungen im Vergleich zu unbehandelten Tieren (siehe Tabelle 3). Die einzige Änderung von Interesse war ein statistisch signifikanter (~2-facher) Anstieg der Globulin-Spiegel und eine begleitende Abnahme des Verhältnisses Albumin/Globulin bei Tieren, die mit liposomalem Topotecan behandelt worden waren. Es wurden keine anderen signifikanten Unterschiede beobachtet.

Tabelle 2. Blutstatus und Differenzialblutbild von ICR Mäusen, die mit einer Dosis von 10 mg/kg von freiem oder in Liposomen verkapseltem Topotecan i.v. behandelt wurden.

Behandlung	Tag nach Injektion	Weißes Differenzialblutbild									
		Leukozyten ($\times 10^9/L$)	Neutro ($\times 10^9/L$)	Lympho ($\times 10^9/L$)	Mono ($\times 10^9/L$)	Eosino ($\times 10^9/L$)	Baso ($\times 10^9/L$)	Erythrozyten ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	Hc (L/L)	Thrombo ($\times 10^9/L$)
Kontrolle		6,47 ± 1,62	0,937 ± 0,201	5,23 ± 1,45	0,180 ± 0,042	0,059 ± 0,039	0,056 ± 0,053	8,67 ± 0,93	142 ± 12	0,438 ± 0,045	717 ± 317
Frei	3	6,70 ± 1,95	0,520 ± 0,200	5,90 ± 1,70	0,177 ± 0,072	0,031 ± 0,021	0,057 ± 0,040	8,47 ± 0,39	136 ± 05	0,444 ± 0,012	879 ± 145
	21	5,16 ± 1,18	0,480 ± 0,122	4,33 ± 0,93	0,247 ± 0,180	0,034 ± 0,016	0,088 ± 0,071	9,81 ± 0,37	154 ± 04	0,493 ± 0,014	907 ± 059
TCS	3	2,82 ± 1,05	0,048 ± 0,018	2,63 ± 0,87	0,109 ± 0,126	0,001 ± 0,001	0,034 ± 0,029	8,93 ± 0,76	141 ± 10	0,463 ± 0,033	564 ± 098
	21	2,54 ± 1,43	0,282 ± 0,167	2,06 ± 1,36	0,133 ± 0,142	0,019 ± 0,011	0,064 ± 0,060	9,41 ± 0,83	154 ± 12	0,486 ± 0,035	1009 ± 161
Leer	3	4,68 ± 1,13	0,598 ± 0,238	3,66 ± 0,93	0,248 ± 0,168	0,081 ± 0,044	0,064 ± 0,055	7,77 ± 0,30	130 ± 05	0,416 ± 0,014	863 ± 143
	21	5,05 ± 0,64	0,898 ± 0,575	3,78 ± 0,88	0,263 ± 0,163	0,038 ± 0,036	0,072 ± 0,057	9,36 ± 0,67	152 ± 08	0,483 ± 0,033	1366 ± 144

Tabelle 3. Serumchemie-Profil von ICR Mäusen, die mit einer Dosis von 10 mg/kg von freiem oder in Liposomen verkapseltem Topotecan i.v. behandelt wurden - Tag 3 nach der Injektion.

Behandlung	BUN (mmol/L)	Kreatinin (μ mol/L)	GE (g/L)	Albumin (g/L)	Globulin (g/L)	Alb/Glob Verhältnis	Bilirubin (μ mol/L)	Alk Phos (IU/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	CPK (IU/L)
Kontrolle	11,3 \pm 3,0	83 \pm 6	46,7 \pm 2,1	31,3 \pm 1,5	15,3 \pm 1,2	2,07 \pm 0,15	4,7 \pm 0,6	86 \pm 12	27 \pm 31	59 \pm 22	87 \pm 107
Frei	9,4 \pm 3,2	82 \pm 18	48,0 \pm 2,1	32,8 \pm 1,3	15,2 \pm 1,1	2,16 \pm 0,15	3,8 \pm 0,8	67 \pm 35	13 \pm 23	55 \pm 10	56 \pm 38
TCS	10,0 \pm 3,9	96 \pm 28	55,8 \pm 11,8	28,8 \pm 2,5	27,0 \pm 10,1	1,18 \pm 0,33	2,5 \pm 0,6	73 \pm 21	23 \pm 17	77 \pm 29	155 \pm 54
Leer	n.d.	68 \pm 13	49,3 \pm 1,2	33,0 \pm 1,7	16,3 \pm 0,6	2,00 \pm 0,17	4,3 \pm 0,6	70 \pm 10	17 \pm 15	53 \pm 6	56 \pm 26

C. Untersuchungen zur Wirksamkeit in Tumormodellen von Mäusen und Menschen: Untersuchungen mit Einzeldosen

1. L1210 Leukämie der Maus. Das intravenöse L1210 Maus-Leukämie-Modell wurde umfangreich eingesetzt, um die unterschiedlichen Aktivitäten von freien und in Liposomen verkapselten chemotherapeutischen Wirkstoffen zu beurteilen und war eines der ursprünglichen (1955–1975) Modelle im in-vivo-Raster des NCI („National Cancer Institute“) für neue chemotherapeutische Wirkstoffe (Plowman, et al., Human tumor xenograft models in NCI drug development. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval" (B. Teicher, Herausgeber), Humana Press Inc., Totowa (1997), Waud, Murine L 1210 and P388 leukemias. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval" (B. Teicher, Herausgeber), Humana Press Inc., Totowa (1997)). Das Modell ist schnell – die durchschnittliche Überlebenszeit unbehandelter Tiere beträgt üblicherweise ~7–8 Tage – und die verabreichten Tumorzellen siedeln sich in der Leber und im Knochenmark ab.

Die Verabreichung von freiem Topotecan als intravenöse Einzeldosis hatte eine minimale Wirkung auf die Überlebenszeit im L1210 Modell (siehe [Fig. 3A](#)). Bei der höchsten Dosis von freiem Topotecan wurde eine mittlere Überlebenszeit von 13 Tagen (44% ILS) beobachtet. Es gab einen Langzeitüberlebenden (Tag 60) in dieser Gruppe. Im Gegensatz dazu führte eine einzige intravenöse Verabreichung von liposomalem Topotecan mit entweder 5 oder 10 mg/kg zu einer Überlebensrate von 100% am Tag 60 (siehe [Fig. 3B](#)). Die mittlere Überlebenszeit für eine Dosis von 1 mg/kg betrug 13 Tage (44% ILS) und die Überlebenskurve war nahezu identisch mit der für freies Topotecan, das mit 30 mg/kg verabreicht wurde – eine 30-fache Verbesserung der Wirksamkeit. Bei höheren Dosierungen (30 mg/kg) des liposomalen Topotecans wurden toxisch bedingte Todesfälle beobachtet. Die MTD für liposomales Topotecan betrug bei BDF-1 Mäusen 20 mg/kg nach einer einzelnen intravenösen Verabreichung.

2. CT-26 Kolonkarzinom der Maus. Die CT-26 Kolonzelllinie der Maus ist zum Suchen nach Arzneimitteln nützlich, weil sie leicht in Form von subcutanen soliden Tumoren wächst oder intravenös verabreicht werden und als Überlebensmodell verwendet werden kann. Wenn die Tumorzellen durch Injektion in die Milz, gefolgt von einer Splenektomie, verabreicht werden, siedeln sich die Zellen darüber hinaus in der Leber ab und führen zu einem experimentellen Metastasen-Modell, das der klinischen Progression eines kolorektalen Karzinoms ähnlicher ist. Das Modell wurde umfangreich eingesetzt und ist zum Beispiel an anderer Stelle ausführlich beschrieben.

Im CT-26 Modell hatte die Verabreichung einer Einzeldosis von Topotecan eine mäßige Auswirkung auf das Überleben, was zu einer % ILS von 23–60 über den Dosisbereich 5–40 mg/kg führte (siehe [Fig. 4](#)). In Liposomen verkapseltes Topotecan war jedoch bei Dosierungen von mehr als 5 mg/kg hochaktiv, was zu einer Überlebensrate von 100% (8/8) am Tag 90 führte. Bei 10 mg/kg wurde am Tag 90 eine Überlebensrate von 87,5% (7/8) beobachtet, jedoch war die Tumormasse in dem toten Tier sehr niedrig, was nahe legt, dass dieses Tier aufgrund anderer Faktoren wie zum Beispiel einer mit der Myelosuppression in Beziehung stehenden Infektion gestorben sein kann. Für liposomales Topotecan wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet, wobei die Dosis mit 2 mg/kg eine % ILS von 54% ergab. Dies wurde als die MED festgesetzt und war der % ILS (58%) vergleichbar, die bei Verwendung von freiem Topotecan bei 40 mg/kg erreicht wurde – eine 20-fache Verbesserung der Wirksamkeit.

3. MX-1 Mammakarzinom des Menschen. MX-1 ist ein experimentelles Modell des Mammakarzinoms beim Menschen und hat Berichten zufolge eine Verdoppelungszeit von 3,9 Tagen (NCI); bei dieser Untersuchung betrug die mittlere Verdoppelungszeit einheitlich 3,6–3,7 Tage. Die Tumorzelllinie stammt vom Primärtumor einer 29-jährigen Frau ohne Chemotherapie in der Vorgeschichte und wird vom DCTD (NCI) Tumordepot als Tumorfragment, das serienmäßig auf nackte Mäuse übertragen wird, angeboten. Histologisch ist MX-1 ein gering differenziertes Mammakarzinom ohne Hinweis auf Drüsenbildung oder Mucinproduktion. MX-1 war eines von 3 Xenograft-Modellen (MX-1, LX-1, CX-1), welche die Tumorgruppe des in-vivo-Vorauswahlverfahrens (1976–1986) des NCI zum Beurteilen neuer chemotherapeutischer Wirkstoffe umfasste (Plowman, et al., Human tumor xenograft models in NCI drug development. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval" (B. Teicher, Herausgeber), Humana Press Inc., Totowa (1997)). Seit dieser Zeit wurde MX-1 in eine größere Gruppe von Mammatumor-Modellen (insgesamt 12) einbezogen, um eine Verlagerung der Strategie des NCI von der „verbindungsorientierten“ Ermittlung hin zur „krankheitsorientierten“ Ermittlung wiederzugeben.

Bei MX-1-Tumoren in einem bestimmten Stadium (100–300 mm³) zeigte freies Topotecan eine dosisabhängige Hemmung des Tumorwachstums (siehe [Fig. 5](#), Tabelle I). Bei der höchsten Dosierung (40 mg/kg) wurde ein optimales % T/C von 24% erreicht, während optimale % T/C-Werte für 10 und 5 mg/kg 66% beziehungsweise 78% betrugen. Es wurden keine mit dem Arzneimittel in Beziehung stehende Todesfälle beobachtet und alle Tiere nahmen während der Untersuchung an Gewicht zu. Die Verkapselung von Topotecan in Liposomen hatte eine merkliche Auswirkung auf das % T/C mit optimalen % T/C-Werten von 8%, -49% und -62% nach einer einzelnen Verabreichung von 2, 5 beziehungsweise 10 mg/kg des Arzneimittels. Ein

negativer % T/C-Wert zeigt eine Regression des Tumolvolumens von dem ursprünglich zugeordneten Stadium der Tumorgröße (100–300 mm³) aus an. Gemäß den Leitlinien des NCI wird ein optimales % T/C < 10% als signifikante Aktivität betrachtet, während Werte < 42% die minimal akzeptable Grenze darstellen, um die Entwicklung eines Arzneimittels weiter voranzutreiben (Corbett, T. et al., In vivo methods for screening and preclinical testing. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval" (B. Teicher, Herausgeber), Humana Press Inc., Totowa (1997)). Die Verkapselung in Liposomen erhöhte die Toxizität von Topotecan, was die MTD von > 40 mg/kg für freies Topotecan auf 10 mg/kg herabsetzte.

4. LX-1 Bronchialkarzinom des Menschen. LX-1 ist ein experimentelles Modell eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) beim Menschen. Die Tumorzelllinie stammt aus dem chirurgischen Präparat einer Metastase, die bei einem 48-jährigen Mann gefunden wurde, und wird vom DCTD (NCI) Tumordepot als Tumormodell, das serienmäßig auf nackte Mäuse übertragen wird, angeboten. Das LX-1 Modell war von 1976–1986 Teil der in-vivo-Tumorgruppe des NCI (Plowman, J. et al., Human tumor xenograft models in NCI drug development. In "Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval" (B. Teicher, Herausgeber), Humana Press Inc., Totowa (1997)) und bleibt, obwohl es jetzt weniger häufig eingesetzt wird, wegen seiner schnellen Wachstumsrate ein nützliches Xenograft-Modell für zwischen freien und liposomalen Arzneimitteln vergleichende Aktivitätsuntersuchungen.

[0059] In Allgemeinen war das LX-1 Modell weniger empfindlich gegen die Wirkungen von Topotecan als das MX-1 Modell, sowohl bei freiem als auch bei in Liposomen verkapseltem Arzneimittel (siehe **Fig. 6**, Tabelle I). Die optimalen T/C-Werte für freies Topotecan betrugen 43%, 55% und 67% für Dosierungen von 30, 10, beziehungsweise 5 mg/kg. Die Wirkung gegen Tumore wurde durch die Verkapselung verbessert, was zu % T/C-Werten von 8%, 11% und 13% für Dosierungen von 30, 10, beziehungsweise 5 mg/kg führte. Interessanterweise zeigten alle Dosierungen von liposomalem Topotecan ähnliche Aktivität. Dies war eine frühe Untersuchung und nachfolgende Untersuchungen an anderen Modellen (siehe **Fig. 4–6**) zeigen, dass die Dosis-Wirkungs-Beziehung bei Dosierungen < 5 mg/kg beginnt. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Verbindungen der Camptothecin-Klasse (und vermutlich andere antineoplastische Wirkstoffe) eine „selbstlimitierende“ Wirksamkeit zeigen können, wobei bei Dosierungen oberhalb einer kritischen Schrankendosis keine weiteren Gewinne bei der Aktivität beobachtet werden (Thompson, Biochim. Biophys. Acta 1400: 301–319 (1998)). Diese Situation könnte denkbarerweise auftreten, wenn das Arzneimittel beschränkten Zugang zu Tumorzellen hat oder wenn das Arzneimittel auf die Gefäßversorgung des Tumors einwirkt und sie zerstört (d.h. eine antiangiogenetische Aktivität hat). In beiden Fällen wäre zu erwarten, dass eine höhere Dosis des Arzneimittels einen vernachlässigbaren Nutzen hat.

[0060] Wie in der L1210 Untersuchung beobachtet wurde, erhöhte die Verkapselung von Topotecan die Toxizität des Arzneimittels und verringerte die MTD. Die MTD in nackten Mäusen mit Tumoren betrug 10 mg/kg (~16% Gewichtsverlust). Bei 30 mg/kg wurden 4/6 mit dem Arzneimittel in Verbindung stehende toxische Todesfälle beobachtet und der maximale Gewichtsverlust erreichte ~29% (Spanne: 27–34%).

D. Untersuchungen zur Wirksamkeit in Tumormodellen von Mäusen und Menschen: Untersuchungen mit mehrfachen Dosierungen

1. MX-1 Mammakarzinom des Menschen. Um sich mit der Wirksamkeit von mehrfachen Dosierungen und verlängerter Einwirkung des Arzneimittels auf den Tumor zu befassen, wurden zwei Protokolle für Mehrfachdosierungen mit MX-1 Xenografts untersucht – die Pläne g3d × 4 und g7d × 3. Beim Plan g4d × 3 zeigte freies Topotecan mit 2,5 und 10 mg/kg/Dosis eine mäßige und bei 1,25 mg/kg/Dosis eine minimale Aktivität (siehe **Fig. 7**, Tabelle II). Die optimalen % T/C-Werte für freies Topotecan bei diesem Dosierungsplan betrugen 55%, 30% und 27% bei jeweils 1,25, 2,5 und 10 mg/kg/Dosis. Bei verkapseltem Topotecan, das nach demselben Dosierungsplan verabreicht wurde, waren die optimalen % T/C-Werte – 15%, – 100%, – 100% und – 100% bei jeweils 0,5, 1,25, 2,5 und 5 mg/kg/Dosis. Alle Tumore, die eine Regression zeigten, wurden über 60 Tage überwacht. Am Ende dieser Periode wurden alle Tiere, die mit ≥1,25 mg/kg/Dosis von liposomalem Topotecan behandelt wurden, als tumorfrei betrachtet.

Bei einem g7d × 3-Dosierungsplan wurde bei freiem Topotecan wenig Aktivität beobachtet, entweder mit 5 oder mit 10 mg/kg/Dosis (siehe **Fig. 8**, Tabelle II). Bei denselben Dosierungen führte liposomales Topotecan eine vollständige Regression der in einem bestimmten Stadium befindlichen Tumoren herbei. Jedoch waren bei diesem Dosierungsplan 10 mg/kg/Dosis zu toxisch und dieser Teil der Untersuchung wurde abgebrochen, als 6/6 toxisch bedingte Todesfälle (oder Einschläferungen) bis zum Tag 24 beobachtet wurden.

2. LX-1 Bronchialkarzinom des Menschen. Anfängliche Untersuchungen (Einzeldosis) mit dem LX-1 Modell zeigten, dass freies Topotecan bei den ausgewerteten Dosierungen < 30 mg/kg inaktiv war und dass liposomales Topotecan das Tumorwachstum hemmte, aber nicht zu einer Regression führte. Um diese Aktivität

zu erhöhen, wurde ein Plan zur mehrfachen ($g7d \times 3$) Dosierung sowohl für freies als auch für liposomales Topotecan untersucht. Unter diesen Umständen wurde eine im Vergleich zur Untersuchung mit Einzeldosen beträchtlich höhere Aktivität für freies Topotecan beobachtet und es wurden optimale % T/C-Werte von 5 und 40 für 30 beziehungsweise 10 mg/kg/Dosis erreicht. Auch liposomales Topotecan zeigte eine signifikant erhöhte Aktivität, die zu einer vollständigen Regression (mit einem nachfolgenden Nachwachsen) bei 5 mg/kg/Dosis führte. Optimale % T/C-Werte für liposomales Topotecan betrugen bei diesem Modell und Dosierungsplan – 55, 3 und 16 für jeweils 5, 2,5, 1,25 mg/kg/Tag.

3. Vergleiche der therapeutischen Breiten (TI). Die therapeutische Breite für freies und liposomales Topotecan wurde in 4 verschiedenen Tumormodellen bei mehreren unterschiedlichen Dosierungsplänen (siehe Tabelle 4) bestimmt. Die Prämissen und Definitionen, die verwendet wurden, um diese Zahlen zu generieren, sind in Tabelle III zu finden. In einigen Fällen wurden eine echte MED oder MTD nicht beobachtet und wurden daher auf der Grundlage von Trends bei den Dosis-Wirkungs-Beziehungen mathematisch berechnet. Zum Beispiel wurde eine MTD von 40 mg/kg für freies Topotecan, das als eine einzelne Bolusinjektion verabreicht wurde, direkt beobachtet, die echte MTD (auf Grundlage des Gewichtsverlustes) läge aber wahrscheinlich näher an 60 mg/kg, wenn das Arzneimittel über 5–10 Minuten infundiert würde. Auch das Niveau der Wirksamkeit der liposomalen Formulierung komplizierte die Auswertung einigermaßen. Eine signifikante Aktivität gegen Tumore wurde bei niedrigen Arzneimitteldosierungen erzielt und die MED musste in bestimmten Untersuchungen geschätzt werden. In diesen Fällen wurde in Tabelle 4 ein Vermerk angebracht.

[0061] Im Allgemeinen war die Steigerung der therapeutischen Breite für liposomales Topotecan relativ hoch für die Verabreichung in Einzeldosen (5, 10, 15 und 18-fach, in Abhängigkeit vom Modell) und nahm mit steigender Dosierungshäufigkeit ab. Dies ist in Tabelle 4 gezeigt, wo das Verhältnis TI_{TCS}/TI_{frei} 4,7–7,5 und 3,3 für die Pläne $g7d \times 3$ beziehungsweise $g3d \times 4$ betrug. Die Abnahme des Verhältnisses TI_{TCS}/TI_{frei} mit häufigerer Dosierung steht in Übereinstimmung mit vorklinischen und klinischen Untersuchungen, die zeigen, dass wie Wirksamkeit und Toxizität von freiem Topotecan vom Dosierungsplan abhängig ist.

Tabelle 4. Relative therapeutische Breiten von freiem und liposomalem Topotecan in Tumormodellen von Mäusen und Menschen.^a

Tumormodell	Inokulationsweg	Dosierungsplan	TI_{frei}	TI_{TCS}	TI_{TCS}/TI_{frei}
L1210 (Maus Leukämie)	i.v.	Einzel	1,3 (2,0) ^b	20	15,4 (10) ^b
CT-26 (Maus Kolon)	i.s.	Einzel	1,0 (1,5) ^b	5,0	5 (3,3) ^b
MX-1 (Mensch Mamma)	s.c.	Einzel	1,4 (2,1) ^b	25	17,9 (11,9) ^b
		q3dx4	15	50 ^c	3,3
		q7dx3	2,0	15,0 ^c	7,5
LX-1 (Mensch Lunge)	s.c.	Einzel	1,3 (2,0) ^b	13,3	10,2 (6,7) ^b
		q7dx3	4,0	18,8	4,7

^a auf Grundlage der Daten in Tabelle II und III; Formeln und Definitionen in Tabelle IV.

^b erhalten unter Verwendung einer direkt beobachteten MTD von 40 mg/kg; der zweite Wert basiert auf einer geschätzten MTD (Körpergewicht).

^c ein zurückhaltender Schätzwert, der ~2-fach größer sein kann; es ist aufgrund hoher Aktivität bei niedrigen Dosierungen schwierig, die MED festzulegen.

E. Diskussion

[0062] Topotecan ist ein hervorragender Kandidat zur Verkapselung in Liposomen. In Kürze ist Topotecan spezifisch für den Zellzyklus (S-Phase) und die Aktivität wird durch eine verlängerte Exposition stark erhöht, Topotecan zeigt eine rasche Pharmakokinetik in Plasma und das Arzneimittel muss bei pH-Werten unter 6,0 gehalten werden, um seine biologische Aktivität zu erhalten. Dies ist ein ideales Szenario für die Verwendung einer von Undichtigkeiten relativ freien liposomalen Verbindung (wie zum Beispiel SM:CH, 55:45), die einen sauren wässrigen Kern hat. Der erforderliche saure Innenbereich kann zum Beispiel durch die Methodik des

pH-Beladens oder des Ionophor-Beladens erzeugt werden. Hier wurde gezeigt, dass die Verkapselung von Topotecan in SM/CH Liposomen mit dem Mg-A23187 Verfahren zu drastischen Steigerungen der Wirksamkeit gegen Tumore führt. Es wurde für liposomales Topotecan auch eine mäßige Steigerung der Toxizität beobachtet, aber diese wurde weitgehend durch erhebliche Dosisreduktionen, mit denen eine im Vergleich zum freien Arzneimittel vergleichbare und in den meisten Fällen höhere Wirksamkeit erzielt wurde, ausgeglichen.

[0063] Die therapeutische Breite (TI) ist ein nützlicher Parameter für die Aktivität des Arzneimittels, da er ein Maß für das Verhältnis der Toxizität (MTD) zur biologischen Aktivität (vom Anwender bestimmter Endpunkt, d.h. MED, ED_{50} oder ED_{80}) ist. Im Allgemeinen ist das Risiko der Toxizität umso höher, je niedriger die TI ist, weil sich die Dosis des Arzneimittels, die erforderlich ist, um eine biologische Wirkung auszulösen, der MTD annähert. Die therapeutische Breite ist besonders nützlich zur Bewertung von liposomalen Arzneimitteln, weil die relative Änderung der TI benutzt werden kann, um den Nutzen (oder das Fehlen desselben) der Verkapselung zu bestimmen. Wie hier gezeigt wurde, verbesserte sich die TI von 3–18-fach in Abhängigkeit vom verwendeten Modell und Dosierungsplan. Daher stellt die nach der Verkapselung von Topotecan in Liposomen beobachtete Verbesserung der biologischen Aktivität mehr als einen Ausgleich für jegliche Steigerungen der Toxizität dar.

[0064] Ohne an irgendeine Theorie gebunden sein zu wollen wird angenommen, dass die signifikanten Verbesserungen der Aktivität gegen Tumore und die gesteigerte Toxizität der liposomalen Form des Arzneimittels auf eine verbesserte Pharmakokinetik und auf das Beibehalten der aktiven Lactonform des Arzneimittels zurückzuführen sind. In diesen Untersuchungen waren 84% des Topotecans nach 24 h als Lactonform im Plasma vorhanden, verglichen mit 48% Lacton für das freie Topotecan nach nur 5 Minuten. Darüber hinaus war, wenn dieselbe Dosis (10 mg/kg) von freiem und liposomalem Topotecan Mäusen intravenös verabreicht wurde, die Konzentration des Lactons bei Zeiten < 1 h ~40-fach höher. Nach 24 h betrug die Konzentration des Lactons im Plasma beim liposomalen Arzneimittel 5,4 µg/ml, verglichen mit 1,5 µg/ml nach 5 Minuten beim freien Arzneimittel – immer noch 3,5-fach höher als die Spitzenkonzentration von Lacton bei freiem Topotecan.

Tabelle I

Zusammenfassung der Parameter der Aktivität gegen Tumore und der Toxizität bei Einzeldosen

			Aktivität gegen Tumore				Toxizität		
Modell		Dosis	% T/C ^a	T-C ^b	% ILS ^c	LCK ^d	TF ^e	DRD ^f	MWL ^g
L1210 (i.v.) NCTEF-005	Frei	5			11		0/8	0/8	+
	Frei	10			22		0/8	0/8	+
	Frei	20			33		0/8	0/8	+
	Frei	30			44		0/8	0/8	+
	Frei	40			55		0/8	0/8	+
	TCS	1			44		0/8	0/8	+
	TCS	5			**		8/8	0/8	+
	TCS	10			**		8/8	0/8	- 9,7
	TCS	20			**		7/7	1/8	- 14,8
	TCS	30			**		3/3	5/8	- 23,4
CT-26 (i.s.) NCTEF-005	Frei	5			31		0/8	0/8	+
	Frei	10			23		0/8	0/8	+
	Frei	40			58		1/8	0/8	- 0,4
	TCS	2			54		0/8	0/8	+
	TCS	5			**		8/8	0/8	- 6,8
	TCS	10			**		7/8	0/8	- 19,1
MX-1 (s.c.) NCTEF-004	Frei	5	78	0,2	0	0,02	0/6	0/6	+
	Frei	10	66	1,4	13	0,12	0/6	0/6	+
	Frei	40	24	4,2	35	0,35	0/6	0/6	+
	TCS	2	8	7,4	65	0,62	0/6	0/6	+
	TCS	5	- 49	10,2	74	0,85	0/6	0/6	- 0,4
	TCS	10	- 62	14,2	83	1,19	1/6	0/6	- 18,3
LX-1 (s.c.) NCTEF-003	Frei	5	67	1,4	0	0,13	0/6	0/6	+
	Frei	10	55	1,9	0	0,18	0/6	0/6	+
	Frei	30	43	2,9	7	0,27	0/6	0/6	- 1,3
	TCS	5	13	7,9	30	0,74	0/6	0/6	- 1,7
	TCS	10	11	8,7	22	0,82	0/6	0/6	- 15,6
	TCS	30	8	9,9	22	0,93	0/6	4/6	- 29,0

^a Optimales % T/C nach der letzten Behandlung. Negative Werte zeigen eine Tumorregression an.^b Verzögerung des Tumorwachstums (Unterschied in der Zeit, die behandelte Tumore und Kontrolltumore benötigen, um 500 mm³ zu erreichen).^c Steigerung der Lebenserwartung im Vergleich zu unbehandelten Tieren (in % angegeben).^d Log Zellabtötung (grob).^e Tumorfremie Tiere am Ende der Untersuchung (d.h. keine sichtbaren Tumore oder Langzeitüberlebende).^f Arzneimittelbedingte Todesfälle.^g Maximaler durchschnittlicher Gewichtsverlust pro Behandlungsgruppe.^h Positive Gewichtsveränderung (d.h. das Gewicht unterschritt zu keinem Zeitpunkt das Gewicht vor der Behandlung).

** Langzeitüberlebende

Tabelle II

Zusammenfassung der Parameter der Aktivität gegen Tumore und der Toxizität bei mehrfachen Dosierungen

Modell		Dosis	Aktivität gegen Tumore				Toxizität		
			% T/C ^a	T-C ^b	% ILS ^c	LCK ^d	TF ^e	DRD ^f	MWL ^g
MX-1 (q3dx4) NCTEF-006	Frei	1,25	55	2,0	20	0,17	0/6	0/6	+ ^h
	Frei	2,5	30	5,0	55	0,42	0/6	0/6	+
	Frei	10	27	2,5	52	0,21	1/6	0/6	+
	TCS	0,5	- 15	23,5	157	1,96	1/6	0/6	- 0,3
	TCS	1,25	- 100	**	**		6/6	0/6	- 1,0
	TCS	2,5	- 100	**	**		6/6	0/6	- 11,5
	TCS	5	- 100	**	**		6/6	0/6	- 20,0
MX-1 (q7dx3) NCTEF-009	Frei	5	58	1,8	27	0,15	0/6	0/6	+
	Frei	10	61	2,0	ND ⁱ		0/6	0/6	- 0,8
	TCS	5	- 100	**	**		6/6	0/6	- 7,6
	TCS	10	- 100	ND ⁱ	ND ⁱ		6/6	6/6	- 29,0
LX-1 (q7dx3) NCTEF-007	Frei	10	40	2,0	21	0,14	0/6	0/6	- 6,2
	Frei	30	5	20,9	58	1,53	0/6	0/6	- 8,8
	TCS	1,25	16	10,8	54	0,79	0/6	0/6	- 7,7
	TCS	2,5	3	23,2	79	1,70	0/6	0/6	- 7,3
	TCS	5	- 55	30,2	100	2,22	0/6	0/6	- 10,5
LX-1 (q7dx3) NCTEF-011	Frei	10	28	4,4	41		0/6	0/6	- 3,6
	Frei	30	9	25	72		0/6	2/6	- 16,4
	TCS	7,5	ND ⁱ	ND ⁱ	ND ⁱ		0/6	6/6	> - 30
	TCS	0,75	27	11,2	50		0/6	0/6	- 1,3

^a Optimales % T/C nach der letzten Behandlung. Negative Werte zeigen eine Tumorregression an.^b Verzögerung des Tumorwachstums (Unterschied in der Zeit, die behandelte Tumore und Kontrolltumore benötigen, um 500 mm³ zu erreichen).^c Steigerung der Lebenserwartung im Vergleich zu unbehandelten Tieren (in % angegeben).^d Log Zellabtötung (grob).^e Tumorfremde Tiere am Ende der Untersuchung (d.h. keine sichtbaren Tumore oder Langzeitüberlebende).^f Arzneimittelbedingte Todesfälle.^g Maximaler durchschnittlicher Gewichtsverlust pro Behandlungsgruppe.^h Positive Gewichtsveränderung (d.h. das Gewicht unterschritt zu keinem Zeitpunkt das Gewicht vor der Behandlung).ⁱ nicht bestimmt; toxisch bedingte Todesfälle in der Liposomen-verkapselten Gruppe.

** „Geheilte“; keine sichtbaren Tumore am Tag 60.

Tabelle III

Definitionen und Formeln für Parameter der Toxizität und der Aktivität gegen Tumore

DRD	<p>Arzneimittelbedingter Todesfall. Ein Todesfall wurde als arzneimittelbedingt betrachtet, wenn das Tier innerhalb von 15 Tagen nach der letzten Behandlung mit dem Arzneimittel starb oder eingeschläfert wurde und sein Tumorgewicht geringer war als die letale Tumormast bei Kontrollmäusen oder sein Gewichtsverlust größer als 20% von dem der Kontrolltiere war.</p>
GI ₅₀	<p>Die Arzneimittelkonzentration, die 50% Wachstumshemmung bei einer Zellpopulation in vitro verursacht. Das NCI benannte den Parameter IC₅₀ um, um die Korrektur auf die Zellzahl zum Zeitpunkt Null herauszustellen. Daher lautet die Formel:</p> $GI_{50} = (T - T_0) / (C - T_0) \times 100 = 50$ <p>T und T₀ sind die optischen Dichten bei 48 beziehungsweise bei 0 h; C ist der Kontrollwert (Zellzahl) der optischen Dichte bei 0 h.</p>
% ILS	<p>Steigerung der Lebenserwartung (in Prozent). Dies wird für Überlebensmodelle aus den mittleren Überlebenszeiten von behandelten (T_{treat}) und Kontrolltieren (T_{cont}) berechnet, gemäß:</p> $(T_{treat} - T_{cont}) / T_{cont} \times 100$ <p>Für Modelle mit soliden Tumoren wurde die Zeit, welche die Tumore benötigten, um 2000 mm³ (~10% des Körpergewichts) zu erreichen, anstelle der mittleren Überlebenszeit als ethischer Abbruchpunkt verwendet.</p>
LCK	<p>Log Zellabtötung (grob). Dieser Parameter veranschlagt die Zahl der log₁₀-Einheiten der am Ende der Behandlung abgetöteten Zellen nach der Formel:</p> $(T - C) \times 0,301 / \text{mittlere Verdoppelungszeit}$ <p>Der Netto-log Zellabtötung kann berechnet werden, indem die Dauer der Behandlung vom Parameter Verzögerung des Tumorwachstums (T - C) subtrahiert wird wie folgt:</p> $[(T - C) - \text{Dauer der Behandlung}] \times 0,301 / \text{mittlere Verdoppelungszeit}$ <p>Ein log Zellabtötung von 0 zeigt an, dass die Zellpopulation am Ende der Behandlung genauso groß ist, wie sie zu Beginn der Behandlung war. Jedoch zeigt ein log Zellabtötung von 4 zum Beispiel eine Abnahme der ursprünglichen Zellpopulation um 99,99% an.</p>

MBWL	Maximaler Verlust an Körpergewicht (in Prozent). Die Tiere werden vor der ersten Verabreichung des Arzneimittels (W_i) und an verschiedenen Tagen während der Untersuchung (W_d) gewogen. Die prozentuale Änderung des Körpergewichts wird berechnet nach: $MBWL = (W_d - W_i) / W_i \times 100$
MED	Minimale wirksame Dosis. Dies ist ein einigermaßen willkürlicher Parameter. Für diese Untersuchungen definierten wir die MED als die niedrigste Dosis, mit der ein optimales % TC ≤ 40 (für Modelle mit soliden Tumoren) oder eine % ILS von 40–60% (für Überlebensmodelle) erreicht wurde.
MTD	Maximal tolerierte Dosis. Dosis des Arzneimittels, das einen MBWL von $\leq 20\%$ verursacht.
% T/C	optimales Verhältnis von behandelten zu Kontrolltumoren, das nach dem ersten Behandlungsablauf erhalten wird. Man erhält diese Werte, indem das mittlere Tumorgewicht am ersten Tag der Behandlungen (T_i oder C_i) von den Tumorgewichten an jedem Beobachtungstag gemäß folgender Formel subtrahiert wird: $\% T/C = (\Delta T / \Delta C) \times 100$, wobei $\Delta T > 0$, oder $\% T/C = (\Delta T / T_i) \times 100$, wobei $\Delta T < 0$ Nach den Aktivitätskriterien des NCI findet das folgende Bewertungssystem Anwendung (Plowman, et al., Human tumor xenograft models in NCI drug development. In „Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval“ (B. Teicher, Herausgeber), Humana Press Inc., Totowa (1997)[22]: 0 = inaktiv, % T/C > 40 1 = Tumorchemmung, % T/C im Bereich 1–40 2 = Tumorstase, % T/C im Bereich 0 bis -40 3 = Tumorregression, % T/C im Bereich -50 bis -100 4 = % T/C im Bereich -50 bis -100 und $> 30\%$ tumorfreie Mäuse
TGD	Verzögerung des Tumorwachstums (auch als T – C dargestellt). Dieser Parameter gibt den Unterschied der Zeit (in Tagen) wieder, die behandelte und Kontrolltumore benötigen, um eine willkürliche Größe (üblicherweise 500 oder 1000 mm ³) zu erreichen.
TI	Therapeutische Breite. Die therapeutische Breite ist das Verhältnis eines Parameters für die Toxizität (d.h. LD ₅₀ , LD ₁₀ , MTD) zu einem Parameter für die biologische Aktivität (d.h. ED ₅₀ – die Dosis, die bei 50% der Therapiegruppe eine definierte biologische Reaktion verursacht). Im Allgemeinen beschreibt TI den Sicherheitsbereich für ein Arzneimittel. Für Untersuchungen im Tiermodell ist dies traditionell mit der Formel: $TI = LD_{50} / ED_{50}$ beschrieben. Da es jedoch ethisch nicht länger zulässig ist, Untersuchungen der LD ₅₀ durchzuführen, haben wir therapeutische Breite für diese Untersuchungen definiert als: $TI = MTD / MED$.

Patentansprüche

1. Liposomale Formulierung, wobei besagte liposomale Formulierung umfasst:

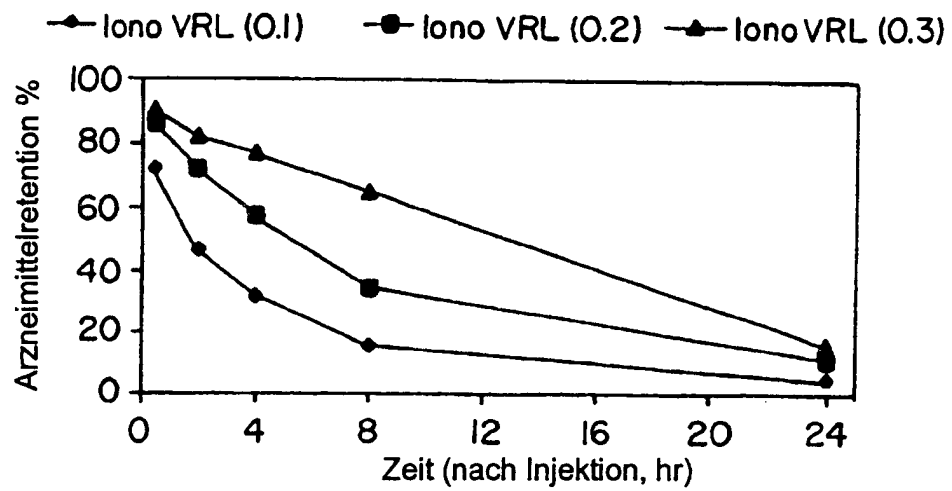
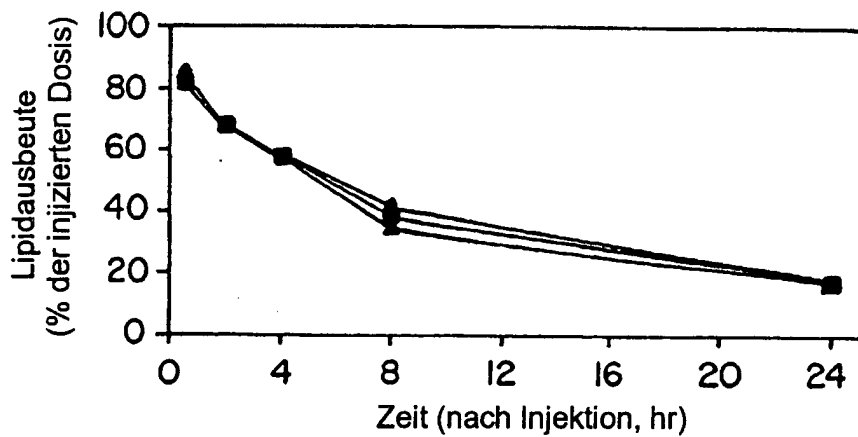
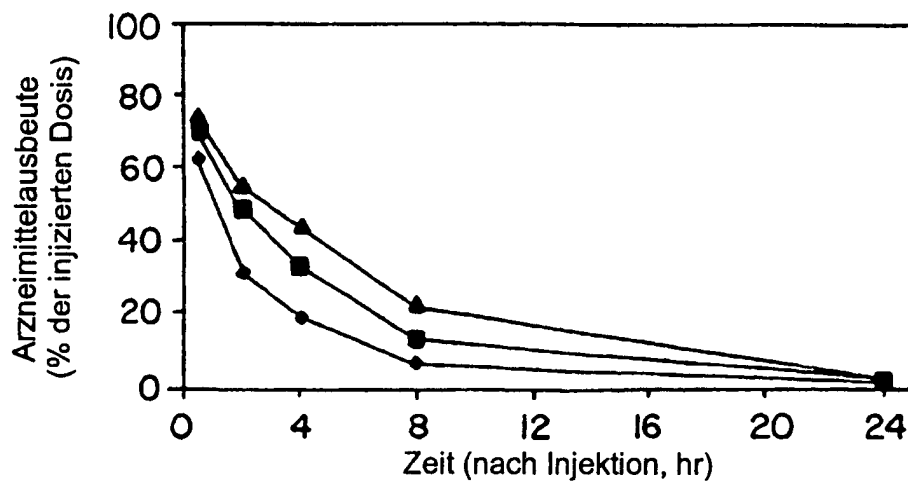
- a) ein antineoplastisches Arzneimittel und
 - b) ein Liposom mit freiem antineoplastischen Arzneimittel und mit präzipitiertem antineoplastischen Arzneimittel, wobei das präzipitierte antineoplastische Arzneimittel in besagtem Liposom mindestens 50% des gesamten antineoplastischen Arzneimittels beträgt, und wobei besagtes Liposom Sphingomyelin und Cholesterin umfasst.
2. Liposomale Formulierung nach Anspruch 1, wobei besagtes antineoplastisches Arzneimittel ein Camptothecin ist.
 3. Liposomale Formulierung nach Anspruch 2, wobei besagtes Camptothecin ein Mitglied ist, welches aus der Gruppe ausgewählt wurde, die aus Irinotecan, Topotecan, 9-Aminocamptothecin, 10,11-Methylenedioxy-camptothecin, 9-Nitrocamptothecin, TAS 103, 7-(4-Methylpiperazinomethylen)-10,11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin und 7-(2-N-Isopropylamino)ethyl)-20(S)-camptothecin besteht.
 4. Liposomale Formulierung nach Anspruch 3, wobei besagtes Camptothecin Topotecan ist.
 5. Liposomale Formulierung nach Anspruch 1, wobei besagtes antineoplastisches Arzneimittel ein Vinca-Alkaloid ist.
 6. Liposomale Formulierung nach Anspruch 5, wobei besagtes Vinca-Alkaloid ein Mitglied ist, welches aus der Gruppe ausgewählt wurde, die aus Vincristin, Vinblastin, Vinorelbin und Vindesin besteht.
 7. Liposomale Formulierung nach Anspruch 6, wobei besagtes Vinca-Alkaloid Vincristin ist.
 8. Liposomale Formulierung nach Anspruch 6, wobei besagtes Vinca-Alkaloid Vinorelbin ist.
 9. Liposomale Formulierung nach Anspruch 1, wobei das freie antineoplastische Arzneimittel und das präzipitierte antineoplastische Arzneimittel unterschiedlich sind.
 10. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Verhältnis des besagten antineoplastischen Arzneimittels zu Lipid 0,005–1:1 (Gew./Gew.) beträgt.
 11. Liposomale Formulierung nach Anspruch 10, wobei das Verhältnis des besagten antineoplastischen Arzneimittels:besagtem Lipid 0,05–0,9:1 (Gew./Gew.) beträgt.
 12. Liposomale Formulierung nach Anspruch 11, wobei das Verhältnis des besagten antineoplastischen Arzneimittels:besagtem Lipid 0,1–0,5:1 (Gew./Gew.) beträgt.
 13. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei besagtes Liposom Sphingomyelin und Cholesterin in einem Verhältnis von 55:45 umfasst.
 14. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, weiter umfassend: (c) ein Liposom ohne verkapselten aktiven Wirkstoff.
 15. Liposomale Formulierung nach Anspruch 14, wobei das Verhältnis von Liposomen mit aktivem Wirkstoff zu Liposomen ohne verkapselten Wirkstoff von 1:0,5 bis 1:1000 beträgt.
 16. Liposomale Formulierung nach Anspruch 15, wobei das Verhältnis von Liposomen mit aktivem Wirkstoff zu Liposomen ohne verkapselten Wirkstoff von 1:1 bis 1:100 beträgt.
 17. Liposomale Formulierung nach Anspruch 16, wobei das Verhältnis von Liposomen mit aktivem Wirkstoff zu Liposomen ohne verkapselten Wirkstoff von 1:2 bis 1:10 beträgt.
 18. Liposomale Formulierung nach Anspruch 17, wobei das Verhältnis von Liposomen mit aktivem Wirkstoff zu Liposomen ohne verkapselten Wirkstoff von 1:3 bis 1:5 beträgt.
 19. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die Formulierung eine Komponente umfasst, die die Präzipitation des besagten antineoplastischen Arzneimittels fördert.
 20. Liposomale Formulierung nach Anspruch 19, wobei besagte Komponente ein mono-, di-, tri- oder po-

lyvalentes Anion ist.

21. Verwendung der liposomalen Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 20 in der Herstellung eines Medikaments zur Krebstherapie.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figuren**FIG. 1A.****FIG. 1B.****FIG. 1C.**

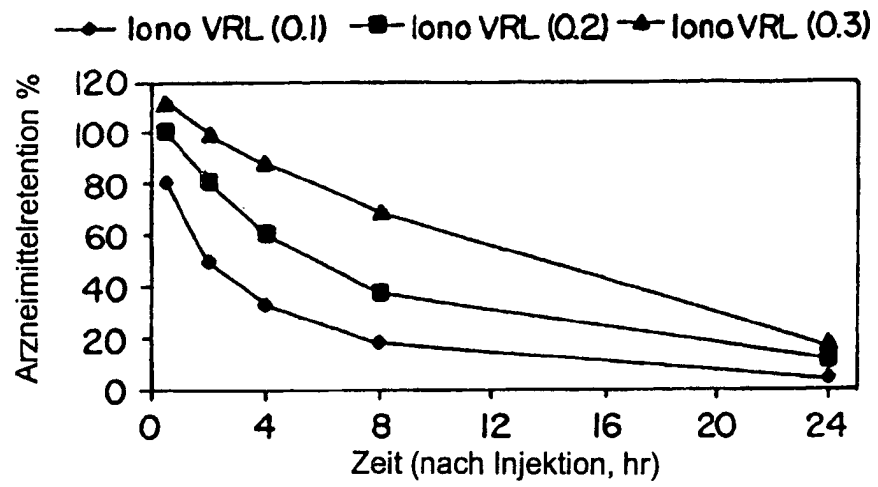


FIG. 2A.

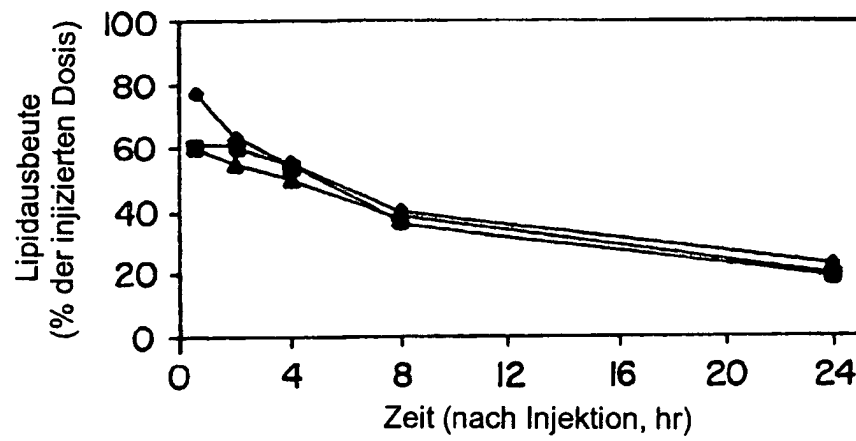


FIG. 2B.

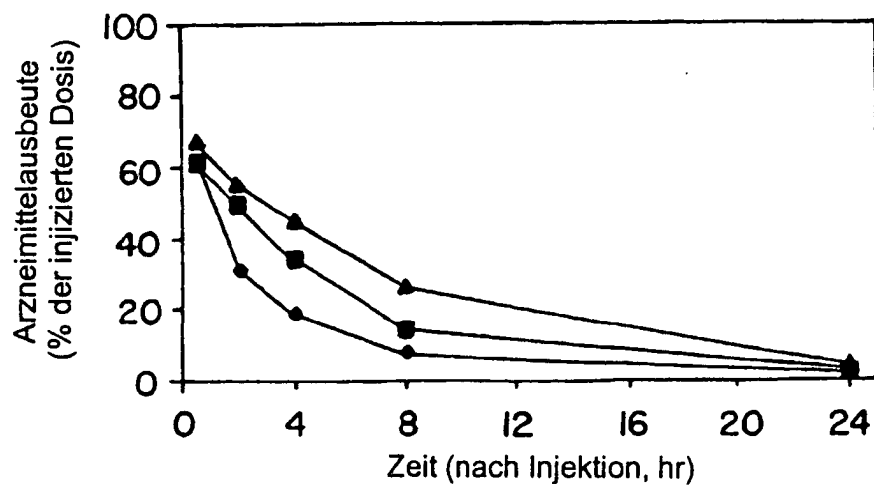


FIG. 2C.

—◆— lono VBL (0.1) —■— lono VBL (0.2) —▲— lono VBL (0.3)/50

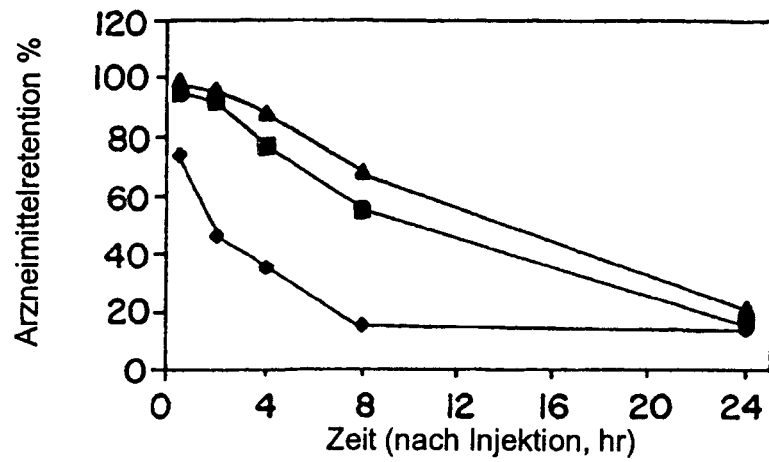


FIG. 3A.

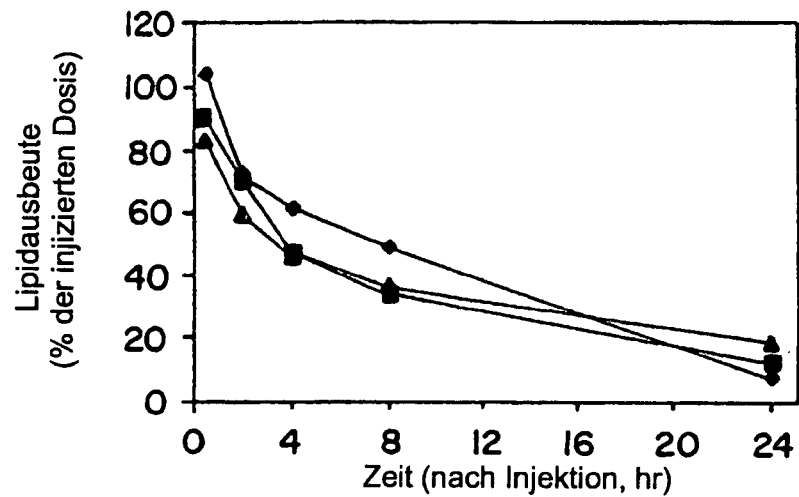


FIG. 3B.

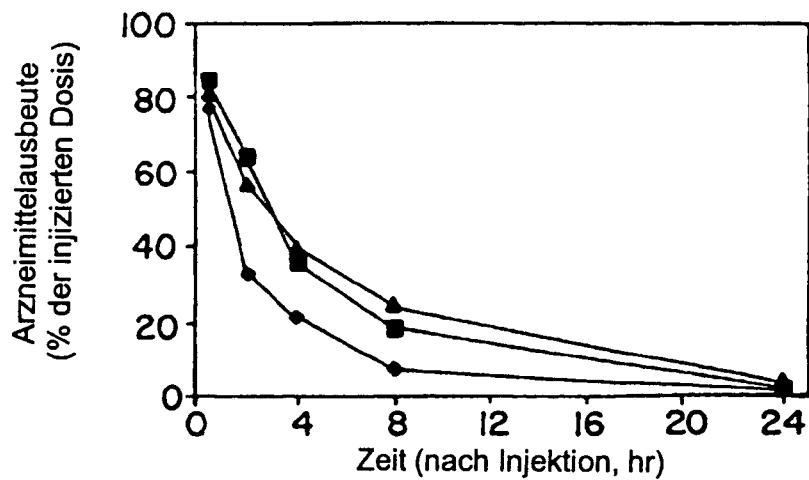


FIG. 3C.

—●— lono VBL (0.1) —■— lono VBL (0.2) —▲— lono VBL (0.3)/50

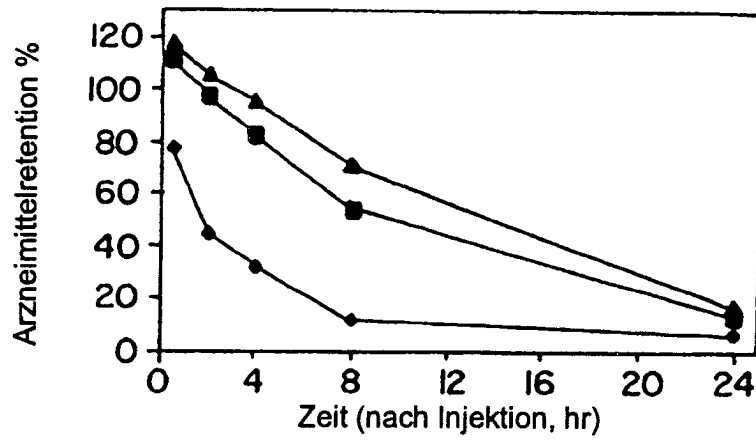


FIG 4A.

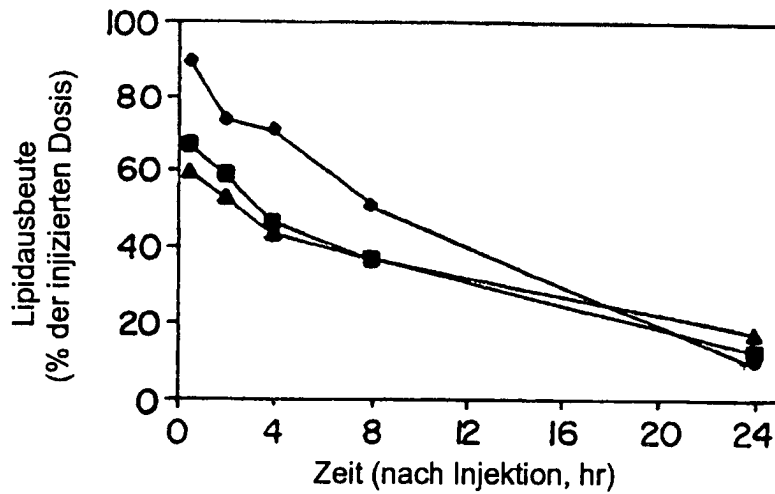


FIG 4B.

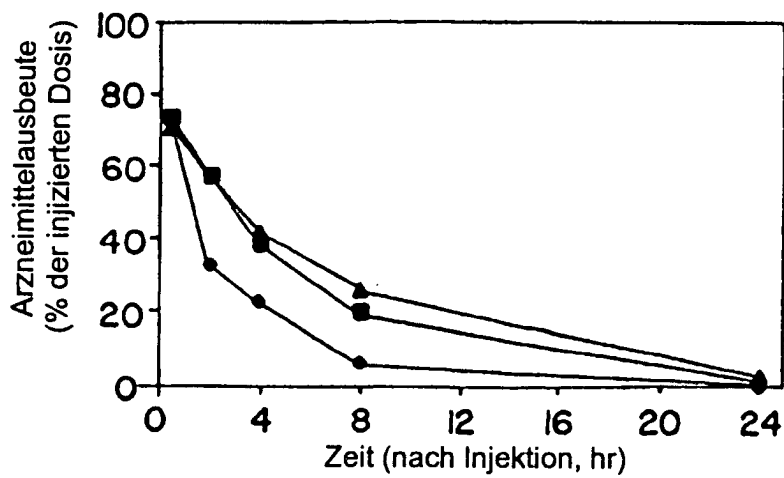


FIG 4C.

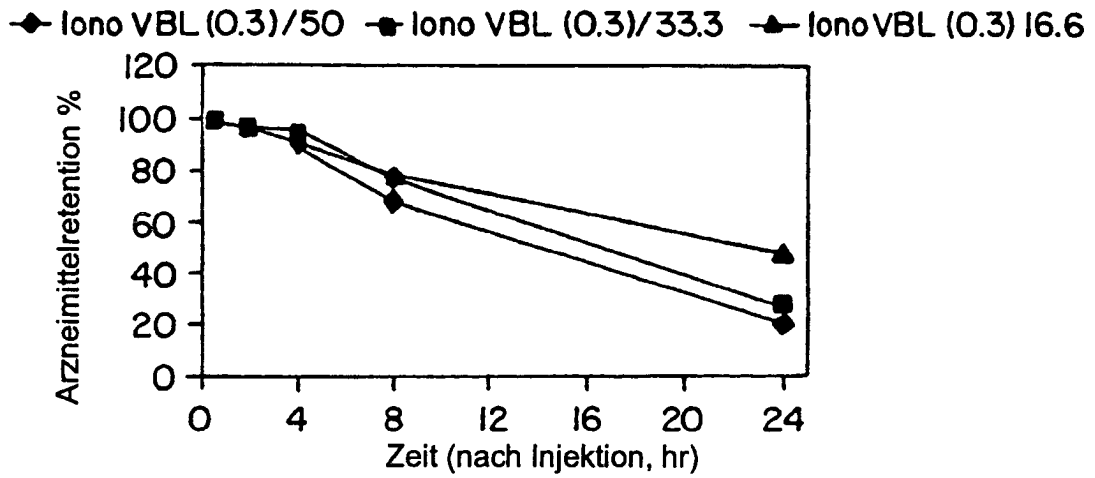


FIG. 5A.

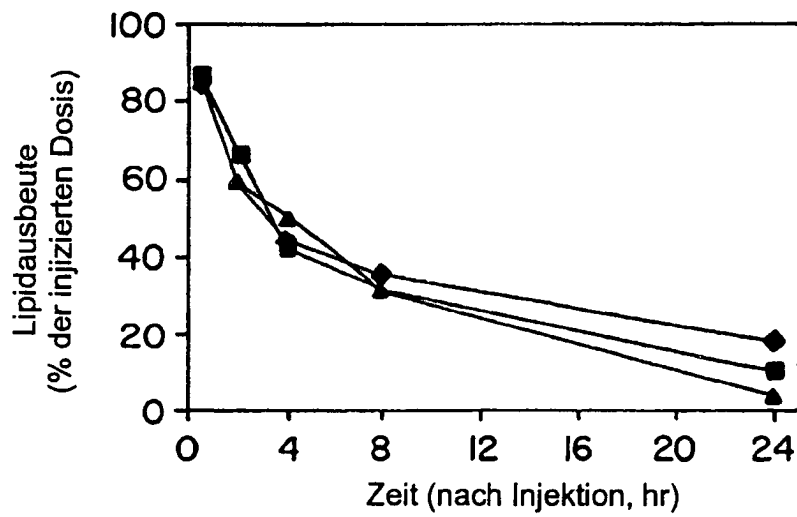


FIG. 5B.

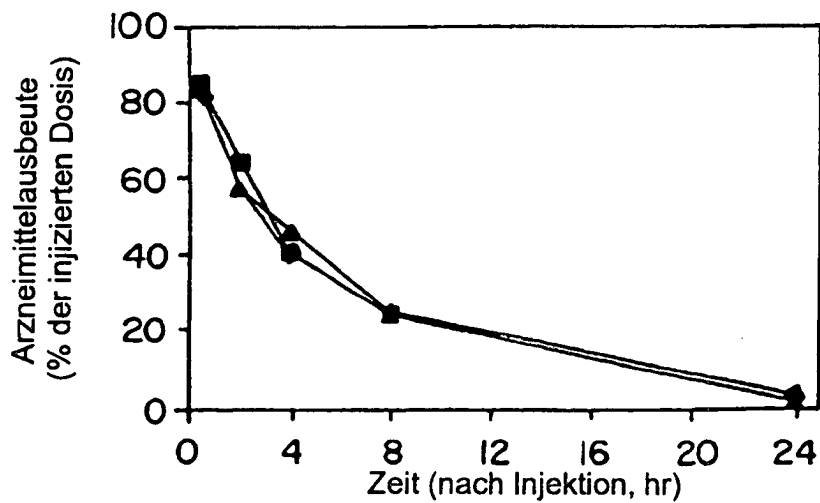


FIG. 5C.

—●— Iono VBL (0.3)/50 —■— Iono VBL (0.3)/33.3 —▲— Iono VBL (0.3)/16.6

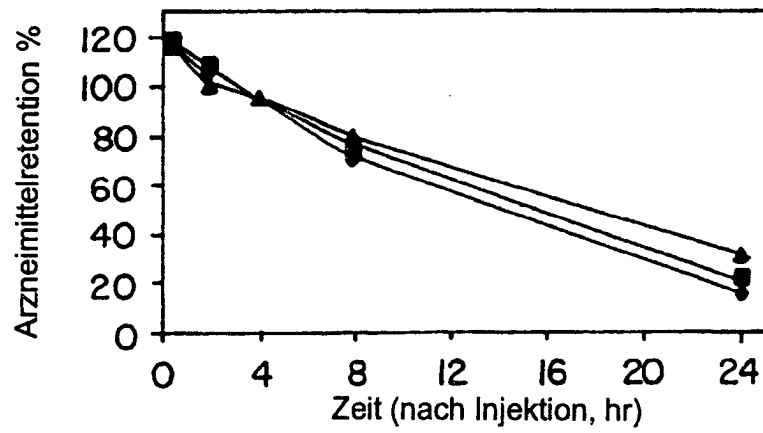


FIG. 6A.

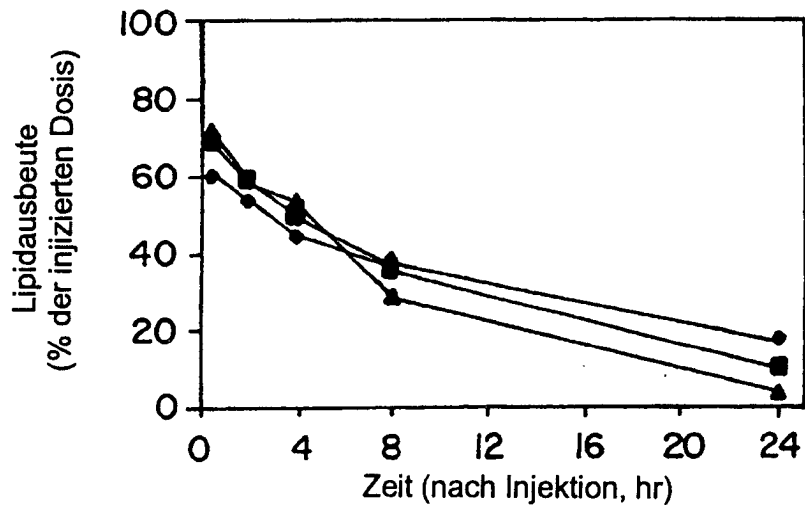


FIG. 6B.

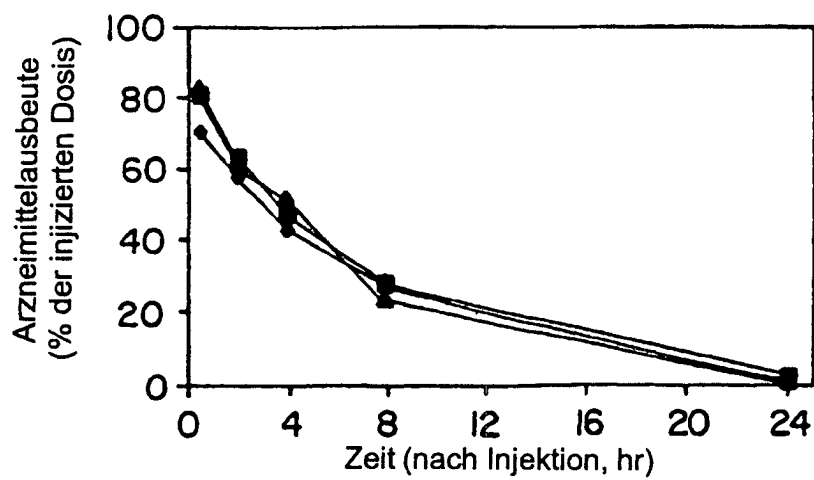


FIG. 6C.

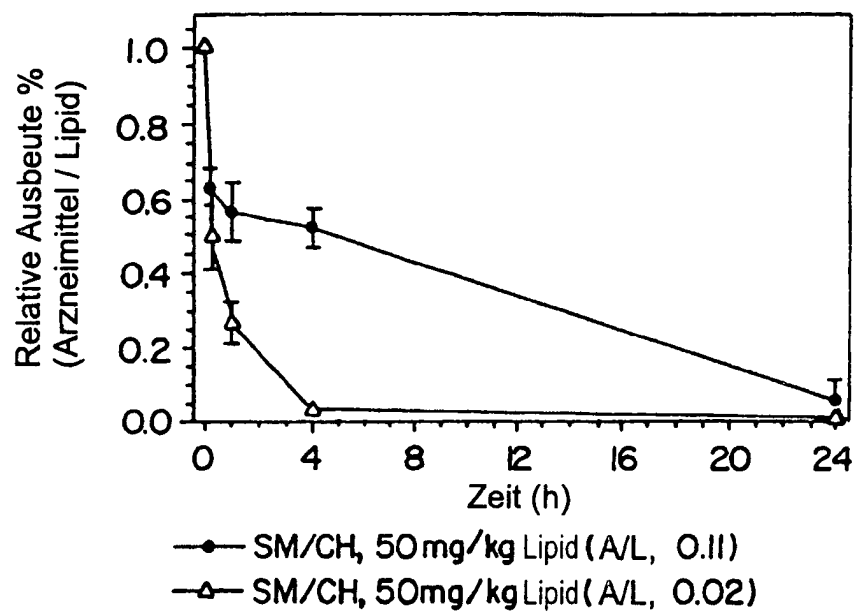


FIG. 7A.

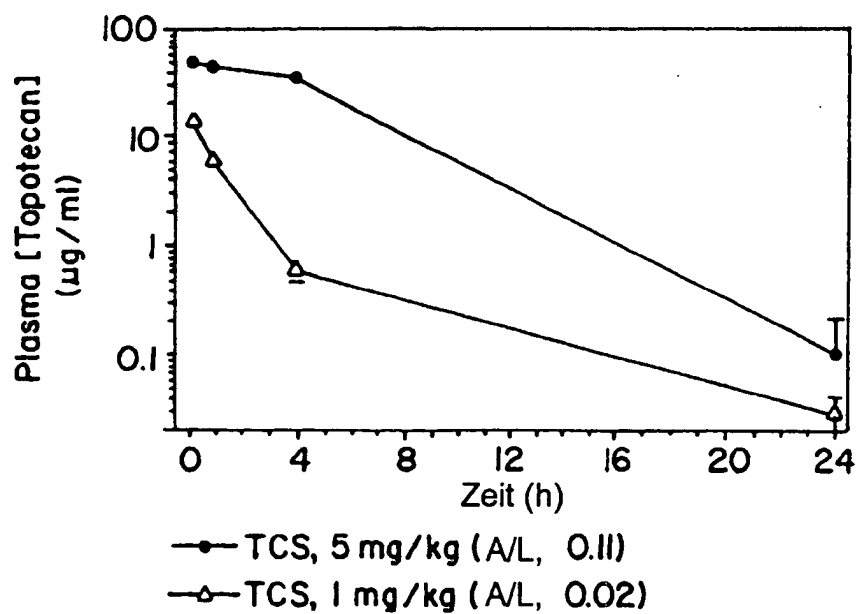


FIG. 7B.