



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 40 03 782 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁵:
C07 F 9/10
A 61 K 9/127
// (A61K 9/127,
31:685)

⑲ Aktenzeichen: P 40 03 782.7
⑳ Anmeldetag: 8. 2. 90
④3 Offenlegungstag: 14. 8. 91

DE 40 03 782 A 1

⑦1 Anmelder:
A. Nattermann & Cie GmbH, 5000 Köln, DE

⑦2 Erfinder:
Ghyczy, Miklos, Dr.; Röding, Joachim, Dr., 5000
Köln, DE; Lautenschläger, Hans, Dr.; Hameister,
Walter, Dr., 5024 Pulheim, DE; Hager, Jörg, 5000
Köln, DE

⑤4 Konservierte Liposome und Verfahren zu ihrer Herstellung

⑤7 Die Erfindung betrifft konservierte, keimarme Liposome
und ein Verfahren zu ihrer Herstellung, das sich durch eine
besonders einfache Handhabung auszeichnet.

DE 40 03 782 A 1

Die Erfindung betrifft konservierte, keimarme Liposome und ein Verfahren zu ihrer Herstellung.

Liposome sind kugelförmige Vesikel mit einer Hülle aus einer oder mehreren Doppelschichten (Bilayer). Sie werden bevorzugt aus Lipiden natürlicher Herkunft erzeugt. In der pharmazeutischen Industrie und auf dem Gebiet der Kosmetik spielen besonders die Liposome aus Phospholipiden eine große Rolle. Die wichtigsten Phospholipidquellen sind die Sojabohne und andere phospholipidreiche Pflanzen, in geringerem Maße werden die Phospholipide auch aus dem Ei oder von Tieren gewonnen.

Unter bestimmten Voraussetzungen sind Phospholipide in der Lage, in wäßriger Lösung Liposome zu bilden (Bangham, A.D., Horne, R.W., J. Mol. Biol. 8 (1964), 660). Seitdem ist auf zahlreiche Art und Weise versucht worden, stabile Liposome, die für eine breite Anwendung Möglichkeiten bieten, herzustellen. Die von Bangham (Bangham, A.D., et al., Meth. in Membrane Biol. 1 (1976), 1–68) vorgeschlagene Methode, Phospholipide in einem organischen Lösungsmittel aufzulösen, letzteres im Rotationsverdampfer zu entfernen, um auf der Kolbenwand einen Lipidfilm zu erhalten, der dann beim Dispergieren in Wasser oder wäßriger Lösung Liposome ausbildet, ist im technischen Maßstab nicht durchführbar. Die so hergestellten Liposome sind nur für einen kleinen Anwendungsbereich zu verwenden.

Liposome können durch die Beschallung von multilamellaren Liposomen, wie sie etwa nach der obigen Methode erhalten werden können, mittels Ultraschall in kleinere, unilamellare Vesikel umgesetzt werden (C. Huang, Biochemistry 8 (1969), 346–352).

Unilamellare Liposomen können ebenfalls mittels der "French Press" bei niederen Drucken hergestellt werden, indem auf übliche Weise hergestellte multilamellare Liposomen-Präparate durch eine enge Öffnung gepreßt werden (Hamilton, R.L., et al., J. Lipid Res. 21 (1980), 981–992).

Eine andere Möglichkeit zur Erzeugung liposomaler Lösungen stellt die Ethanol-Injektionsmethode von Batzri und Korn dar (Batzri, S., Korn, E.D., Biochim. Biophys. Acta 298 (1976), 1015–1019). Hierbei wird das in Ethanol gelöste Lipid in eine wäßrige Pufferlösung injiziert, so daß sich Liposome bilden. Dieses Verfahren ist, genauso wie die Filmmethode von Bangham, nicht in technischem Maßstab durchführbar. Bei beiden Methoden muß außerdem das organische – möglicherweise sogar toxische – Lösungsmittel aufwendig entfernt werden, um pharmazeutisch oder kosmetisch anwendbare Präparate zu erhalten.

Eine liposomale Lösung kann durch Gefriertrocknen des bei der Filmtechnik hergestellten Lipidfilms hergestellt werden, d. h. das Lösungsmittel wird nicht durch ein Vakuum, sondern durch Lyophilisation entfernt (DE-OS 28 18 655). Beim Re-Dispergieren des gefriergetrockneten Lipidfilms in Wasser entstehen naturgemäß wieder Liposome.

Große unilamellare Liposomen werden auch gebildet, wenn geladene Lipide in einem Puffer in Gegenwart von Calcium-Kationen suspendiert werden (Papahadjopoulos, D., Ann. N.Y. Acad. Sci. 308 (1978) p. 751). Nach Entfernung der Calcium-Kationen bilden sich dann große unilamellare Liposomen.

Eine neuere Methode zur Bildung von Liposomen besteht darin, Phospholipide mit einem kationischen Detergens in ein organisches Lösungsmittel zu geben

und das Lipidgemisch auf eine fein verteilte bzw. fein strukturierte Oberfläche wie Molekularsiebe, Quarz oder Zeolithe zu bringen (D.D. Lasic, J. of Coll. and Interface Sci. 124 (2), (1988), 428–435) und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum zu entfernen. Dabei entstehen direkt Phospholipid-Vesikel.

Eine allgemeine Übersicht über die gebräuchlichsten Methoden zur Liposomenherstellung geben z. B. die Artikel von Szoka, F. et al. in Ann. Rev. Biophys., Bioeng. 9 (1980), 467–508 und Lasic, D.D. in Biochem. J. 256 (1988), 1–11.

Sowohl in der kosmetischen als auch bei der pharmazeutischen Anwendung werden naturgemäß sehr hohe Anforderungen an die Sterilität und Pyrogenfreiheit der Liposomen gestellt, damit diese Systeme ohne Nebenwirkungen gefahrlos verwendet oder verabreicht werden können.

Bisher sind nur wenige Verfahren bekannt, die sterile, keimarme Liposomen oder liposomale Systeme betreffen. Eine Übersicht gibt J. Freise in Liposome Technology, Vol. I (ed. by G. Gregoriadis, 1986), p. 132–137.

Bevorzugt ist hiernach die Filtration der erzeugten Liposomenlösung durch ein entsprechendes Millipore-Filter® der Größe 0,22 µm. Allerdings werden dann größere Liposomen nicht mit filtriert, so daß nur ein Teil des ursprünglichen Lösungsvolumens erhalten bleibt.

Liposome können auch durch Gefriertrocknung (DE-OS 29 04 047) konserviert werden.

Die EP-A 01 58 441 beschreibt Pro-Liposome aus Lecithin, Ethanol und Wasser, die für die Herstellung von Liposomen verwendet werden. Eine Aussage zur Sterilität findet sich in dieser Anmeldung nicht.

Andere chemische oder physikalische Verfahren führen meist sehr schnell zu einer Zerstörung der Doppelschichtmembran und sind daher für eine breite Anwendung nicht geeignet.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß es möglich ist, konservierte und sterile Liposomen herzustellen, wenn diese mit Ethanol oder 2-Propanol konserviert werden. Ebenso ist es überraschend, daß der Alkohol nicht zu einer Zerstörung des liposomalen Systems führt.

Auch ist es überraschend, daß man aus einem einfachen Ausgangsmaterial, nämlich Phospholipiden und Alkohol, durch einfaches Verdünnen mit Wasser oder geeigneten Pufferlösungen, die gewünschten Liposomen bzw. in der Endformulierung eine liposomale Lösung erhält.

Das Verfahren ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß es mit jedem handelsüblichen Laborrührer in einem beliebigen geeigneten Gefäß ausgeführt werden kann. Grundvoraussetzung ist lediglich eine genügend große Drehzahl, so daß eine starke Durchmischung in kurzer Zeit erreicht wird.

Als Ausgangsmaterial dient ein Phospholipid-Alkohol-Gemisch ohne weitere Zusatzstoffe.

Die Phospholipide haben innerhalb dieses Gemisches die nachstehende Zusammensetzung:

Phosphatidylcholin:	60–80 Gew.-%
saure Phospholipide:	1–30 Gew.-%
sonstige Phospholipide:	1–30 Gew.-%

wobei in der vorliegenden Erfindung Phospholipide wie Phosphatidsäure, Phosphatidylethanolamin oder etwa N-Acylphosphatidylethanolamin zu den sauren Phospholipiden gerechnet werden. Als sonstige

Phospholipide sind etwa Phosphatidylinosit oder Lyso-Phosphatidylcholin anzusehen.

Innerhalb der vorgenannten Grenzen für die Zusammensetzung des Phospholipidgemisches haben sich zwei Phospholipidgemische als besonders geeignet für die Herstellung der erfindungsgemäßen Liposome erwiesen:

Phospholipidgemisch A:

- 80 Gew.-% Phosphatidylcholin
- 1–19 Gew.-% saure Phospholipide
- 1–19 Gew.-% sonstige Phospholipide

Phospholipidgemisch B:

- 60 Gew.-% Phosphatidylcholin
- 10–30 Gew.-% saure Phospholipide
- 10–30 Gew.-% sonstige Phospholipide

Diese Phospholipidgemische können aus Phospholipidgemischen, wie sie in natürlichen Ölsaaten enthalten sind, durch entsprechende Aufarbeitung, etwa nach der EP-S 00 69 770, erhalten werden.

Versuche mit anderen Mischungsverhältnissen als den oben angegebenen oder mit reinem Phosphatidylcholin führten nicht zu den erfindungsgemäßen Formulierungen.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist auch darin zu sehen, daß für die Herstellung der Liposomen und der liposomalen Lösung keine zusätzlichen energieaufwendigen Schritte wie Temperaturerhöhung, Ultraschall oder dergl. mehr nötig sind.

Die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen können mit einem Gehalt an Phospholipiden von 10 bis 20% hergestellt werden. Bevorzugt werden jedoch solche mit 10% Phospholipidanteil hergestellt.

Die Formulierungen haben einen konstanten Alkoholgehalt von 16%, so daß der Anteil an Wasser zwischen 64 und 74% beträgt, abhängig von der Menge an Phospholipid in der Endformulierung. Anstelle von Wasser können auch übliche Pufferlösungen, wie etwa Phosphat-Puffer oder Salzlösung verwendet werden.

Für die Herstellung der Liposomen-Dispersionen werden folgende Phospholipidgemische als Ausgangsmaterial verwendet:

	Gemisch I	Gemisch II
Phosphatidylcholin	80 Gew.-%	60 Gew.-%
Lyso-Phosphatidylcholin	3 Gew.-%	2 Gew.-%
Phosphatidylethanolamin	6 Gew.-%	19 Gew.-%
Phosphatidsäure	9 Gew.-%	6 Gew.-%
N-Acyl-Phosphatidyl-ethanolamin		5 Gew.-%
Phosphatidylinosit	2 Gew.-%	8 Gew.-%

Somit enthält Gemisch I 19 Gew.% saure Phospholipide und Gemisch II 30 Gew.% saure Phospholipide.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

Es sollen 100 g des erfindungsgemäßen Produktes mit Gemisch I und Ethanol hergestellt werden.

Dazu werden 10 g Gemisch I in 1,8 g Ethanol aufgelöst. Die Lösung hat eine Viskosität von 806 mPas (bei 25° C) und ist homogen. In dieser Zusammensetzung beträgt das Phospholipid zu Ethanol-Verhältnis 85 : 15.

Die Lösung wird mit 47 g entmineralisiertem Wasser in einem üblichen schnellaufenden Laborrührer während 3 Minuten homogenisiert. Es bildet sich ein transparentes Gel mit 17% Phospholipid-Gehalt. Das Gel wird mit dem gleichen Rührer mit 27 g einer 0,1 molaren Na₂HPO₄/K₂HPO₄-Pufferlösung versetzt und 4 Minuten verrührt. Die entstehende dünnflüssige Dispersion wird mit 14,2 g Ethanol versetzt und noch 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt.

100 g des Endproduktes hat dann die Zusammensetzung:

- 10 g Phospholipide
- 16 g Ethanol
- 74 g Wasser

Die Teilchengröße beträgt, gemessen nach der Laserstreuungsmethode, 204 nm (± 20%), die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g, damit entspricht die Konservierung den USP21 – und DAB9-Normen.

Die nachfolgenden Beispiele 2 bis 8 führen ebenfalls zu einem Endprodukt, das die Zusammensetzung

- 10 g Phospholipide
- 16 g 2-Propanol oder Ethanol und
- 74 g Wasser

aufweist.

Beispiel 2

Analog Beispiel 1 werden 10 g Gemisch I in 2,5 g Ethanol gelöst (Phospholipide : Ethanol ist 80 : 20) und mit 47 g entmineralisiertem Wasser 3 Minuten gerührt, bis ein homogenes Gel entsteht (Phospholipidgehalt: 16,8%). Das Gel wird mit 27 g Leitungswasser versetzt und 4 Minuten verrührt, dann wird 13,5 g Ethanol zugegeben und 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße beträgt 194 nm (± 20%). Die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g (entsprechend USP21 und DAB9).

Dieses Beispiel zeigt, daß sich auch mit einfachsten Ausgangssubstanzen sehr leicht die liposomalen Lösungen herstellen lassen. Die in Leitungswasser üblicherweise vorhandenen Verunreinigungen wie Mikroorganismen und Salze sowie ein ungleichmäßiger pH-Wert haben keine Auswirkungen auf die Qualität der liposomalen Lösung.

Beispiel 3

Analog Beispiel 1 werden 10 g Gemisch I in 5,4 g Ethanol gelöst (Phospholipide : Ethanol ist 65 : 35) und mit 47 g entmineralisiertem Wasser 3 Minuten gerührt. Es entsteht ein transparentes Gel mit 16% Phospholipidgehalt.

Das Gel wird mit 27 g 0,9 prozentigen Salzlösung versetzt und 4 Minuten verrührt, dann 10,6 g Ethanol zugegeben und 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße beträgt 154 nm (± 20%). Die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g (entsprechend USP 21 und DAB9).

Beispiel 4

Analog Beispiel 1 werden 10 g Gemisch I in 10 g 2-Propanol gelöst (Phospholipide : 2-Propanol ist 50 : 50) und mit 47 g entmineralisiertem Wasser 3 Minuten gerührt. Es entsteht ein transparentes Gel mit 15% Phospholipidgehalt. Das Gel wird mit 27 g einer 0,1 molaren $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Pufferlösung versetzt und 4 Minuten verrührt, dann 6 g 2-Propanol zugegeben und 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt.

Die mittlere Teilchengröße beträgt 122 nm ($\pm 20\%$). Die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g (entsprechend USP21 und DAB9).

Beispiel 5

Analog Beispiel 1 werden 10 g Gemisch I in 2,5 g 2-Propanol gelöst (Phospholipide : 2-Propanol ist 80 : 20); und mit 47 g entmineralisiertem Wasser 3 Minuten gerührt. Es entsteht ein transparentes Gel mit 16,8% Phospholipidgehalt.

Das Gel wird mit 27 g einer 0,1 molaren $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Pufferlösung versetzt und 4 Minuten verrührt, 13,5 g 2-Propanol zugegeben und 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße beträgt 167 nm ($\pm 20\%$). Die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g (entsprechend USP21 und DAB9).

Beispiel 6

Analog Beispiel 1 werden 10 g Gemisch I in 1,2 g 2-Propanol gelöst (Phospholipide : 2-Propanol ist 90 : 10) und mit 47 g entmineralisiertem Wasser 3 Minuten gerührt. Es entsteht ein transparentes Gel mit 17,2% Phospholipidgehalt.

Das Gel wird mit 27 g Leitungswasser versetzt und 4 Minuten verrührt, 14,8 g 2-Propanol zugegeben und 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße beträgt 196 nm ($\pm 20\%$). Die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g (entsprechend USP21 und DAB9).

Beispiel 7

Analog Beispiel 1 werden 10 g Gemisch II in 1,8 g Ethanol gelöst (Phospholipide : Ethanol ist 85 : 15) und mit 47 g entmineralisiertem Wasser 3 Minuten gerührt. Es entsteht ein transparentes Gel mit 17% Phospholipidgehalt. Das Gel wird mit 27 g Leitungswasser versetzt und 4 Minuten verrührt, dann 14,24 g Ethanol zugegeben und 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße beträgt 182 nm ($\pm 20\%$). Die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g (entsprechend USP21 und DAB9).

Beispiel 8

Analog Beispiel 1 werden 10 g Gemisch II in 2,5 g 2-Propanol gelöst (Phospholipide : 2-Propanol ist 80 : 20) und mit 47 g entmineralisiertem Wasser 3 Minuten gerührt. Es entsteht ein transparentes Gel mit 16,8% Phospholipidgehalt.

Das Gel wird mit 17 g einer 0,1 molaren $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung versetzt und 4 Minuten verrührt, dann 13,5 g 2-Propanol zugegeben und 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt.

Die mittlere Teilchengröße beträgt 162 nm ($\pm 20\%$).

Die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g (entsprechend USP21 und DAB9).

Patentansprüche

1. Liposome aus Phospholipiden, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit Alkoholen konserviert sind.
2. Liposome nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial natürliche Phospholipide, die aus Ölsaaten gewonnen werden, verwendet werden.
3. Liposome nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial aus

60 – 80 Gew.% Phosphatidylcholin,
1 – 30 Gew.% saure Phospholipide,
1 – 30 Gew.% sonstige Phospholipide,

besteht.

4. Liposome nach Anspruch 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial aus

80 Gew.% Phosphatidylcholin
1 – 19 Gew.% saure Phospholipide,
1 – 19 Gew.% sonstigen Phospholipiden,

besteht.

5. Liposome nach Anspruch 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial aus

60 Gew.% Phosphatidylcholin,
10 – 30 Gew.% sauren Phospholipiden,
10 – 30 Gew.% sonstigen Phospholipiden,

besteht.

6. Liposome nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Alkohol Ethanol oder 2-Propanol ist.

7. Liposome nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Alkoholgehalt in der Endformulierung 16% Gewichtsprozent beträgt.

8. Liposomale Lösung, enthaltend die Liposome nach den Ansprüchen 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Phospholipidgehalt max. 20%, üblicherweise 10% beträgt.

9. Verfahren zur Herstellung einer liposomalen Lösung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein Phospholipid-Alkohol-Gemisch nach Anspruch 2 bis 5 mit soviel Wasser gerührt wird, daß ein Gel entsteht und nach weiterer Zugabe von Wasser, Pufferlösung oder Salzlösung die gewünschte liposomale Lösung entsteht.

10. Verfahren zur Herstellung einer liposomalen Lösung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial ein flüssiges Phospholipid-Alkohol-Gemisch ist.