(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENT- UND MARKENAMT

(12) **Patentschrift**

(10) **DE 40 03 782 C 2**

(51) Int. Cl.[6]:
C 07 F 9/10
A 61 K 9/127

(21) Aktenzeichen: P 40 03 782.7-43
(22) Anmeldetag: 8. 2. 90
(43) Offenlegungstag: 14. 8. 91
(45) Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 11. 3. 99

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

(73) Patentinhaber:
A. Nattermann & Cie GmbH, 50829 Köln, DE

(74) Vertreter:
Patentanwälte Dr. Ulrich Beines, Philipp Lau-Loskill, 41189 Mönchengladbach

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

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
EP 01 58 441 A1

(54) Liposomales System und Verfahren zu dessen Herstellung

(57) Liposomales System, das mindestens ein Phospholipid, Wasser sowie einen Alkohol enthält, dadurch gekennzeichnet, daß das mindestens eine Phospholipid ein aus Ölsaaten gewonnenes Phospholipid ist, daß das Phospholipid
60–80 Gew.-% Phosphatidylcholin,
1–30 Gew.-% saure Phospholipide und
1–30 Gew.-% sonstige Phospholipide
aufweist und daß das liposomale System als Konservierungsmittel ausschließlich den Alkohol enthält.

DE 40 03 782 C 2

DE 40 03 782 C 2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein liposomales System mit den Merkmalen des Oberbegriffs des Patentanspruchs 1 sowie ein Verfahren zu dessen 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, bei dem es sich um Ei-Lecithin oder Phosphalidylcholin, das mit Skarylamin versetzt ist, handelt, 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, die jedoch nur eine sehr begrenzte Lagerstabilität aufweisen.

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 28 18 655 A).

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 m. Allerdings werden dann größere Liposomen nicht mit filtriert, so daß nur ein Teil des ursprünglichen Lösungsvolumens erhalten bleibt.

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

Die EP 0 158 441 A 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.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein konserviertes und steriles liposomales System zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird durch ein liposomales System mit den kennzeichnenden Merkmalen des Patentanspruchs 1 gelöst.

Das erfindungsgemäße liposomale System weist mindestens ein Phospholipid, Wasser sowie einen Alkohol auf. Hierbei ist in dem erfindungsgemäßen liposomalen System als Phospholipid mindestens ein aus Ölsaaten gewonnenes Phospholipid enthalten, wobei das Phospholipid

60 bis 80 Gew.-% Phosphatidylcholin
1 bis 30 Gew.-% saure Phospholipide und
1 bis 30 Gew.-% sonstige Phospholipide

aufweist. Als Konservierungsmittel ist in dem erfindungsgemäßen liposomalen System ausschließlich ein Alkohol enthalten.

In der vorliegenden Erfindung gehören Phospholipide, wie z. B. Phosphatidsäure, Phosphatidylethanolamin oder etwa N-Acylphosphatidylethanolamin zu den sauren Phospholipiden. Als sonstige Phospholipide sind etwa Phosphatidylinosit oder Lyso-Phosphatidylcholin anzusehen.

Innerhalb der vorgenannten Grenzen für die chemische Zusammensetzung des Phospholipids haben sich zwei Phospholipidgemische als besonders geeignet in dem erfindungsgemäßen liposomalen System 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 0 069 770, 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.

Das erfindungsgemäße liposomale System kann mit einem Gehalt an Phospholipiden von 10 bis 20% hergestellt werden. Bevorzugt werden jedoch solche mit 10% Phospholipidanteil hergestellt.

Das erfindungsgemäße liposomale System hat vorzugsweise 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.

Als Alkohol enthält das erfindungsgemäße System insbesondere Ethanol oder 2-Propanol.

Die vorliegende Erfindung betrifft desweiteren ein Verfahren zur Herstellung eines liposomalen Systems der vorstehend genannten Art.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird als Ausgangsmaterial ein aus Ölsaaten gewonnenes Phospholipid ausgewählt, das
60 bis 80 Gew.-% Phosphatidylcholin
1 bis 30 Gew.-% saure Phospholipide und
1 bis 30 Gew.-% sonstige Phospholipide
enthält. Dieses Phospholipid wird anschließend mit einem Alkohol gemischt und hiernach unter Rühren mit so viel Wasser versetzt, daß ein Gel entsteht. Dieses Gel wird dann durch weitere Zugabe von Wasser, Pufferlösung oder Salzlösung in das gewünschte liposomale System überführt.

Überraschend konnte festgestellt werden, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren aus einfachen Ausgangsmaterialien, nämlich Phospholipiden der vorstehend genannten Art und Alkoholen, durch Verdünnen mit Wasser oder geeigneten Pufferlösungen, ein gewünschtes liposomales System oder eine liposomale Lösung erhältlich ist. Hierbei läßt sich das erfindungsgemäße Verfahren mit jedem handelsüblichen Laborrührer in einem beliebigen Gefäß ausführen, wobei an den Laborrührer lediglich die Voraussetzung zu stellen ist, daß er eine so große Drehzahl besitzt, daß eine starke Durchmischung in kurzer Zeit erreicht wird.

Vorzugsweise wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren das Phospholipid mit dem Alkohol zu einem flüssigen Phospholipid-Alkohol-Gemisch umgesetzt.

Insbesondere werden zur Herstellung des erfindungsgemäßen liposomalen Systems die nachfolgend aufgeführten Phospholipid-Gemische I oder II eingesetzt.

	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-Phosphatidylethanolamin		5 Gew. %
Phosphatidylinosit	2 Gew. %	8 Gew. %

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

Alle Prozentangaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf Gewichtsprozent.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

Es sollen 100 g des liposomalen Systems aus dem 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 Na_2HPO_4/K_2HPO_4-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 Laserstreulichtmethode, 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 liposomale 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 prozentiger Salzlösung versetzt und 4 Minuten verrührt, dann werden 10,6 g Ethanol zugegeben und es wird 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße beträgt 154 nm (± 20%). Die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g (entsprechend USP 21und 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 Na_2HPO_4/K_2HPO_4-Pufferlösung versetzt und 4 Minuten verrührt, dann werden 6 g 2-Propanol zugegeben und es wird 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt.

Die mittlere Teilchengröße beträgt 122 nm (± 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 Na_2HPO_4/K_2HPO_4-Pufferlösung versetzt und 4 Minuten verrührt, 13,5 g 2-Propanol werden zugegeben und es wird 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße beträgt 167 nm (± 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 werden zugegeben und es wird 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße beträgt 196 nm (± 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 werden 14,24 g Ethanol zugegeben und es wird 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt. Die mittlere Teilchengröße beträgt 182 nm (± 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 Na_2HPO_4/K_2PO_4-Pufferlösung versetzt und 4 Minuten verrührt, dann werden 13,5 g 2-Propanol zugegeben und es wird 1 Minute bis zum fertigen Endprodukt weitergerührt.

Die mittlere Teilchengröße beträgt 162 nm (± 20%). Die Keimzahl liegt unter 100 Keime/g (entsprechend USP21 und DAB9).

Patentansprüche

1. Liposomales System, das mindestens ein Phospholipid, Wasser sowie einen Alkohol enthält, **dadurch gekennzeichnet**, daß das mindestens eine Phospholipid ein aus Ölsaaten gewonnenes Phospholipid ist, daß das Phospholipid
60–80 Gew.-% Phosphatidylcholin,
1–30 Gew.-% saure Phospholipide und
1–30 Gew.-% sonstige Phospholipide
aufweist und daß das liposomale System als Konservierungsmittel ausschließlich den Alkohol enthält.
2. Liposomales System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Phospholipid aus
80 Gew.-% Phosphatidylcholin,
1–19 Gew.-% sauren Phospholipiden und
1–19 Gew.-% sonstigen Phospholipiden
besteht.
3. Liposomales System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Phospholipid aus
60 Gew.-% Phosphatidylcholin,
10–30 Gew.-% sauren Phospholipiden und
10–30 Gew.-% sonstigen Phospholipiden
besteht.
4. Liposomales System nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Alkohol Ethanol oder 2-Propanol ist.
5. Liposomales System nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Alkoholgehalt in der Endformulierung 16 Gew.-% beträgt.
6. Liposomales System nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das liposomale System max. 20 Gew.-%, vorzugsweise 10 Gew.-% Phospholipid aufweist.
7. Verfahren zur Herstellung eines liposomalen Systems nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangsmaterial ein aus Ölsaaten gewonnenes Phospholipid auswählt, das
60–80 Gew.-% Phosphatidylcholin,
1–30 Gew. % saure Phospholipide und
1–30 Gew.-% sonstige Phospholipide
enthält, daß man das Phospholipid anschließend mit einem Alkohol mischt und anschließend hierzu unter Rühren so viel Wasser zusetzt, daß ein Gel entsteht, wobei man das Gel durch weitere Zugabe von Wasser, Pufferlösung oder Salzlösung in das gewünschte liposomale System überführt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man das Phospholipid mit dem Alkohol zu einem flüssigen Phospholipid-Alkohol-Gemisch umsetzt.

- Leerseite -