



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 137 T2** 2004.07.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 731 703 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 137.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/PT94/00013**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 903 468.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/015762**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.12.1994**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **15.06.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.09.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **10.09.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.07.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 31/70**

**A61K 9/127, A61P 31/12**

(30) Unionspriorität:

**10142293 06.12.1993 PT**

(74) Vertreter:

**HOFFMANN · EITLÉ, 81925 München**

(73) Patentinhaber:

**Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial/Instituto de Biotecnologia, Quimica Fina e Tecnologias Alimentares, Lissabon/Lisboa, PT; Meirinhos da Cruz, Maria Eugenia, Lissabon/Lisboa, PT; Goncalves Barbosa, Carlos Mauricio, Porto, PT; Cabral Caldeira, Luis Filipa Diniz, Lissabon/Lisboa, PT**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**CH, DE, ES, FR, GB, IE, IT, LI**

(72) Erfinder:

**MEIRINHOS DA CRUZ, Eugenia, Maria, P-1500 Lisboa, PT; GON ALVES BARBOSA, Mauricio, Carlos, S. Jo o da Foz, P-4100 Porto, PT; CABRAL CALDEIRA, Filipe, Luis, P-1500 Lisboa, PT**

(54) Bezeichnung: **LIPOSOMFORMULIERUNGEN ENTHALTEND VIDARABIN ODER SEINE DERIVATE**

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] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Herstellung von Liposomenformulierungen, die Vidarabin und/oder ein Vidarabin-Derivat, z. B. Vidarabinmonophosphat (ARA-AMP), und Gemische von Glycerophospholipiden mit gesättigten und ungesättigten Acyl-Ketten mit Cholesterol (CHOL) und geladenen Molekülen, die lipidisch sind oder nicht (z. B. Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylglycerol (PG), Stearylamin (SA), Phosphatidsäure (PA)) enthalten.

[0002] Liposome sind biologisch verträgliche und biologisch abbaubare mikrovesikuläre Systeme (Gregoriadis und Florence 1993), die aus einer oder mehreren Phospholipid-Doppelschichten, die getrennte wäßrige Kompartimente umgeben, bestehen. Diese Vesikel sind fähig, alle Arten von Substanzen, z. B. Arzneimittel, zu enthalten. In Abhängigkeit von ihrer Polarität wird eine Verbindung in einem Liposom entweder in den inneren wäßrigen Kompartimenten oder in den hydrophoben Regionen der Lipid-Doppelschicht eingeschlossen. Liposome können als sterile oder pyrogenfreie Suspensionen mit Submikrondurchmesser hergestellt werden, damit sie intravenös injiziert werden können. Aufgrund ihrer strukturellen Vielseitigkeit bezüglich der Größe, der Lipidzusammensetzung, oder Oberflächenladung, der Doppelschichtfluidität und der Fähigkeit, ein Arzneimittel ungeachtet der Löslichkeit einzubauen oder Liganden an ihrer Oberfläche zu tragen, haben Liposome das Potential in einer Vielzahl von Wegen gezielt aufgebaut zu werden, um ihre pharmakokinetischen Charakteristika zu modulieren und die Produktion von Formulierungen zu gewährleisten, die für eine klinische Verwendung optimal sind.

[0003] Vidarabin (9- $\beta$ -D-Arabinofuranosyladenin-adeninarabinosid, ARA-A) und sein wasserlöslicheres Derivat Vidarabinmonophosphat (9- $\beta$ -D-Arabinofuranosyladeninmonophosphat, ARA-AMP) sind Purinnukleoside, die DNA-Polymerase in Viren und in geringerem Ausmaß in Säugetieren inhibieren. Von diesen Agenzien wurden gezeigt, daß sie in vitro antivirale Aktivität gegen eine ganze Reihe von DNA-Viren, z. B. Herpes simplex, Typ I und II, Varicella-zoster, Epstein-Barr, Cytomegalovirus, Vaccinia- und Hepatitis B-Virus (HBV) (Shannon 1975), haben. Die klinische Verwendbarkeit von ARA-A wird durch seine schlechte wäßrige Löslichkeit (Schabel 1968) begrenzt, die dazu führt, daß es durch intravenöse Infusion in großen Flüssigkeitsvolumina verabreicht wird. Dagegen ist ARA-AMP wasserlöslich (LePage et al. 1972) und kann in einem kleinen Volumen Injektionsfluid intravenös oder intramuskulär verabreicht werden.

[0004] Persistierende HBV-Infektionen sind in der Welt weit verbreitet, allerdings ungleichmäßig verteilt mit Prävalenzraten von 10 bis 20% für die Küstenregionen in China, Südostasien und in Afrika südlich der Sahara bis weniger als 0,5% in Nordwesteuropa, Nordamerika und Australien. Es wurde kürzlich geschätzt, daß es weltweit nahezu 300 Millionen aktiv infizierte Träger von HBV-Markern gibt (Ayoola et al. 1988; Gerin 1992). Diese Infektion ist der Hauptgrund für eine chronische Lebererkrankung und stellt eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität in der gesamten Welt dar. Obgleich der Infektion durch Impfung vorgebeugt werden kann, gibt es demnach einen Bedarf, um wirksame Formen einer antiviralen Therapie für existierende Träger zu entwickeln, um die Qualen zu reduzieren, die chronische aktive Hepatitis, Zirrhose und hepatozelluläres Karzinom einschließen (Tiollais et al. 1990; Lunel-Fabiani 1991; Marcellin 1991).

[0005] ARA-A und ARA-AMP sind zwei der wenigen Arzneimittel mit erwiesener Wirksamkeit in der Behandlung von chronischer Hepatitis Typ B bei Menschen. Einige Forscher haben entweder ARA-A oder ARA-AMP selbst (Weller 1986; Trepo et al. 1986; Guardia et al. 1986; Thomas 1988; Marcellin et al., 1989) oder in Kombination mit anderen therapeutischen Modalitäten (Scullard et al. 1981; Smith et al. 1982; Yokosuka et al. 1985; Guillemin et al. 1993) verwendet, um Patienten mit chronischer Hepatitis, verursacht durch HBV, zu behandeln. Diese beiden Arzneimittel zeigten eine konstante Wirkung bei der Blockierung des Viruswachstums, bei der Förderung einer beständigen Abnahme der Replikation viraler Marker während der Behandlung und eine Reduzierung der Serumlevel an Virus-DNA-Polymerase in dosisabhängiger Art. Obgleich ARA-A und ARA-AMP konstant bewiesen haben, daß sie eine Verbesserung der Leberfunktion und Histologie und einen Verlust an Infektivität bei einem deutlichen Anteil der Patienten zeigen, hat ihre Verwendung widersprüchliche Resultate bezüglich der Serokonversionsraten und der Langzeitwirksamkeit hervorgerufen. Tatsächlich ist die therapeutische Anwendung von Vidarabin durch seine Toxizität stark eingeschränkt. Die kumulativen dosisabhängigen Nebenwirkungen, die bei therapeutischen Level an ARA-A und ARA-AMP beobachtet wurden, beinhalten hauptsächlich neurologische Störungen, z. B. das neuromuskuläre Schmerzsyndrom und hämatologische und gastrointestinale Störungen (Sacks et al. 1982; Whitley et al. 1980-a und 1980-b; Kanterewicz et al. 1990; Lok 1990). Diese Probleme bilden einen Hauptnachteil, der eine Unterbrechung der Behandlung notwendig macht und die Fortsetzung klinischer Untersuchungen behindert.

[0006] Mit dem Ziel, den chemotherapeutischen Index von Vidarabin zu erhöhen, koppelten Fiume et al. (1980) entweder ARA-A oder ARA-AMP an Asialofetuin, ein Neoglykoprotein mit endständigem Galactosyl, das selektiv durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in Hepatozyten eindringt. Eine Hauptnachteil bei der klinischen Verwendung dieser Konjugate war ihre Immunogenität, die überwunden wurde, indem lactosaminiertes

homologes Albumin als hepatotroper Träger für ARA-AMP verwendet wurde (Fiume et al., 1981, 1982-a, 1985, 1986, 1986-a, 1987, 1988-a, 1988-b). Nach Injektion dieses Konjugats in infizierte Mäuse (Fiume et al. 1981, 1982-b, 1986-a) und/oder Waldmurmeltiere (Ponzetto et al. 1991) wurde die Synthese von viraler DNA bei niedrigeren Konzentrationen als denen des nicht-gekoppelten Arzneimittels inhibiert. In einer einleitenden klinischen Untersuchung wurde das Konjugat für drei Personen an Patienten mit chronischer HBV-Infektion verabreicht, was die Virusreplikation inhibierte (Fiume et al. 1988-c). Diese Strategie kann die dosisabhängigen Nebenwirkungen reduzieren. Allerdings ist der Träger nicht allgemein verfügbar und um Menschen injiziert zu werden, muß er aus humanem Plasma erhalten werden, was ein zusätzliches potentielles Problem darstellt. Darüber hinaus wurde beobachtet, daß hohe Dosen an Konjugat Vacuolen im Cytoplasma von Histiocyten, Hepatozyten und Nierentubuluszellen bei Cynomolgus-Affen (Renoldi et al. 1990) und in Leberzellen von Ratten und Mäusen (Fiume et al. 1992) erzeugten. In Cynomolgus-Affen hat das Konjugat auch neuromuskuläre Anzeichen für Toxizität gezeigt (Renoldi et al. 1990). Ein anderes System, das von Fiume et al. (1986-b) entwickelt wurde, basiert auf einem anderen Träger, der durch galactosyliertes Poly(L-lysin) gebildet wurde. Obgleich dieser gegenüber lactosaminiertem humanen Serumalbumin einige Vorteile besitzt, ist dieses System eher toxisch, wodurch die Möglichkeit seiner klinischen Verwendung ausgeschlossen wird. Mit der identischen Aufgabe, den therapeutischen Index von Vidarabin zu erhöhen, beluden Guise et al. (1990) Nanopartikel von Polyisohexylcyanoacrylat mit ARA-A, allerdings verlor das Agens seine antivirale Aktivität infolge einer chemischen Wechselwirkung mit dem Cyanoacryl-Monomer während des Polymerisationsprozesses.

[0007] Die Verwendung von Liposomen als Arzneimittelträger kann die Konzentrierung eines Arzneimittels in besonderen Geweben begünstigen, die Arzneimittellevel in Serum und in Geweben verlängern, die Toxizität verringern und/oder die Wirksamkeit des eingekapselten Arzneimittels erhöhen (Hwang 1987, Sculier 1988, Lopez-Berestein et al. 1989, Perez-Soler 1989, Szoka 1990, Gregoriadis und Florence 1993). Darüber hinaus öffnet eine bevorzugte Aufnahme von Liposomen durch Leberzellen (Scherphof et al. 1983, Poste et al. 1984) einige bedeutende therapeutische Perspektiven im besonderen Fall von viraler Hepatitis. So kann der Einschluß von Vidarabin in Liposomen durch Veränderung der Bioverteilung einen zweckdienlichen Ansatz zur Verbesserung seines therapeutischen Index bilden, wodurch eine Verstärkung der Arzneimittelabgabe an den infizierten Stellen begünstigt wird und in Geweben vermieden wird, in denen das Arzneimittel toxische Wirkungen erzeugt. Darüber hinaus können Liposome Vidarabin im Blutstrom vor seiner schnellen Desaminierung durch Adenosindesaminase schützen, welche das Arzneimittel in 9- $\beta$ -D-Arabinofuranosyl-hypoxanthin (ARA-Hx) transformiert (Buchanan et al. 1980, Whitley et al. 1980-a und 1980-b). Dieses ist um ein Mehrfaches weniger aktiv als ARA-A oder ARA-AMP als antivirales Agens (Gephart und Lerner 1981). Ein Einschluß von ARA-A in Liposomen wurde in der Vergangenheit versucht, allerdings nur mit begrenztem Erfolg, da die Einkapselungseffizienz der Formulierungen sehr gering war, nämlich im Bereich von 2,2 bis 6,1% lag (Mayhew et al. 1984).

[0008] Dementsprechend gibt es auf dem Fachgebiet einen Bedarf für ein Verfahren zur Herstellung von Liposomenformulierungen von Vidarabin oder einem Vidarabin-Derivat mit hoher Einbaueffizienz und hoher intraliposomaler Arzneimittelkonzentration, geringer relativer Toxizität für den Patienten und hoher pharmakologischer Aktivität gegen das Virus.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die vorliegende Erfindung richtet sich auf die Herstellung von stabilen Liposomen mit effizienter Einarbeitung und hohen Leveln an intraliposomalem Vidarabin (oder Vidarabin-Derivat). Wenn diese Formulierungen Tieren verabreicht werden, sind sie nicht toxisch und nicht immunogen, akkumulieren in großem Ausmaß in der Leber (entweder in Hepatozyten oder in Kupferzellen) und Milz, verlängern die Verweilzeit des Arzneimittels im Blutstrom und die Erhöhung seines therapeutischen Index.

[0010] Das Verfahren zur Herstellung von Liposomenformulierungen ist durch die Bildung mehrschichtiger Liposomen, die das antivirale Mittel enthalten, und Unterwerfen der Liposome einer Lyophilisierung, einer kontrollierten Rehydratisierung und gegebenenfalls einem Extrudieren unter Druck gekennzeichnet. Nach der Herstellung werden die Formulierungen wieder einer Lyophilisierung unterworfen und unter Vakuum bei 4°C gelagert.

#### BESCHREIBUNG DER SPEZIFISCHEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0011] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung stellen Liposomenformulierungen (bzw. liposomale Formulierungen) von Vidarabin (oder Vidarabin-Derivat) mit hoher Einarbeitungseffizienz und hoher intraliposomaler Arzneimittelkonzentration, geringer Toxizität und hoher pharmakologischer Aktivität bereit.

[0012] Die vorliegende Erfindung umfaßt ein Verfahren einer Dehydratisierung und kontrollierten Rehydratisierung, gefolgt von einem fakultativen Extrudierverfahren durch eine poröse Membran oder ein anderes Liposomen-Klassierungsverfahren und eine zweite Dehydratisierung. Dieses Verfahren umfaßt die folgenden

Schritte: a) mehrschichtige Liposome (= multilamellar liposomes = MLV), die intra- und extraliposomales Arzneimittel enthalten, werden hergestellt; b) Dehydratisieren durch Lyophilisierung der MLV; c) kontrollierte Rehydratisierung unter Verwendung isotonischer Mannit-Lösung, physiologischer Salzlösung oder eines anderen physiologischen Osmolaritätsmediums; d) Verdünnung der Liposome vor einem fakultativen Extrudieren unter Verwendung eines hohen Verdünnungsvolumens an isoosmotischem Medium; e) Extrudieren unter Verwendung von Ausgangsmaterial, das vorher noch nicht von extraliposomalen Arzneimittel abgetrennt wurde; f) Abtrennung von extraliposomalen Arzneimittel; g) Lyophilisierung der Endpräparation.

[0013] Erfindungsgemäß wird zur Herstellung mehrschichtiger Liposome ein Chloroform- oder Chloroform-Methanol-Lipid-Gemisch (im Bereich von etwa 50 mM bis 100 mM oder mehr) unter Stickstoffstrom getrocknet. Die resultierende Gesamtlipid-Konzentration liegt im Bereich von etwa 10 mM bis zu etwa 100 mM. Geeignete Lipide, die hydriert sind oder nicht, liegen zur Verwendung in den Formulierungen einzeln oder in Gemischen in verschiedenen Anteilen vor: Cholesterol (CHOL), Phosphatidylcholin (PC), hydriertes Phosphatidylcholin (HPC), Distearylphosphatidylcholin (DSPC), Sphingomyelin (SM), Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), Dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG), Phosphatidylglycerol (PG), Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC), Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Ganglioside, Ceramide, Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidsäure (PA), Dicetylphosphat (DcP), Dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG), Stearylamin (SA), Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) und irgendwelche ähnlichen synthetischen Lipide. Das Lipidgemisch ist vorzugsweise geladen. Die Liposomen-Präparationen sind typischerweise Gemische aus mindestens zwei Komponenten und üblicherweise drei oder mehr: Glycerophospholipid (z. B. PC, DMPC, DPPC), CHOL (gegebenenfalls vorhanden) und einem geladenen Molekül (lipidisch oder nicht): z. B. PI, PG, SA oder ein anderes geladenes Molekül, wobei jede Komponente der Liposomen-Präparation (wenn vorhanden) in molaren Verhältnissen von 40 bis 70%, 10 bis 50%, bzw. 5 bis 25% vorliegt.

[0014] In Abhängigkeit von der Löslichkeit des verwendeten Vidarabin-Derivats wird das Arzneimittel zusammen mit den Lipiden gelöst oder im wässrigen Hydratisierungsmedium dem Lipidfilm zugesetzt.

[0015] Für die Einkapselung eines wasserlöslichen Vidarabin-Derivats, z. B. ARA-AMP werden die Komponenten des Lipidgemisches so ausgewählt, daß mindestens eine Komponente (z. B. Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerol, Stearylamin) geladen ist und die wässrigen Kompartimente der Liposomen, in denen das wasserlösliche Vidarabin-Derivat lokalisiert ist, vergrößert. Für ARA-AMP sind kationische Moleküle, z. B. Stearylamin, am vorteilhaftesten, da sie auch fähig sind, elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Arzneimittel zu entwickeln. Das positiv geladene Molekül ist in einer Konzentration von mindestens 5 bis 25%, vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 17% der Gesamtlipidkomponenten vorhanden. Beispielsweise ist eine bevorzugte Kombination Phosphatidylcholin : Cholesterol : Stearylamin im Verfahren 10 : 5 : 3, wobei die Gesamtlipidkonzentration von 17 bis 75 mM oder mehr reicht. Das resultierende positiv geladene Lipid Ausgangsgemisch produziert stabile Liposome mit hohen ARA-AMP-Einkapselungseffizienzen und hohen intraliposomalen Arzneimittelkonzentrationen, während die mit dem Arzneimittel assoziierte Toxizität minimiert ist und die antivirale Wirksamkeit maximiert ist. Der Lipidfilm wird mit einer wässrigen Lösung von ARA-AMP hydratisiert. Die Konzentration der Arzneimittellösung kann beträchtlich variieren, von niedrig wie etwa 0,06 mg/ml bis so hoch wie 6 mg/ml oder mehr, ist aber typischerweise 1 mg/ml bis zu 5 mg/ml, wie es in einem Beispiel unten beschrieben wird. Die entsprechende Konzentration an Lipid zur Hydratisierung liegt im Bereich von 17 mM bis zu einer Höhe von 85 mM oder mehr. Es ist wünschenswert, Liposome mit einem hohen Arzneimittel/Lipid-Verhältnis zu produzieren, ohne die Sättigung der lipidischen Membran der Liposome zu übersteigen. Über der Sättigung wird die Einkapselungseffizienz reduziert sein, ohne daß das intraliposomale Arzneimittel erhöht ist. Demnach ist es wichtig, daß die Einkapselungseffizienz des Verfahrens möglichst hoch ist, um Liposome zu produzieren, die adäquate Mengen an therapeutischem Arzneimittel enthalten, selbst bei einer geringen Anfangsmenge an Arzneimittel.

[0016] Wie oben angegeben wurde, kann die Konzentration an Vidarabin in der Lipidlösung oder in der wässrigen Lösung, die zur Hydratisierung des Lipidfilms verwendet wird, und somit im Endliposom in Abhängigkeit von dem besonderen ausgewählten Arzneimittel, den Komponenten des lipidischen Gemisches, der Ionenstärke, Osmolarität, dem pH, der Temperatur und dem verwendeten Einarbeitungsverfahren beträchtlich variieren. Vidarabin oder Derivate können in der resultierenden antiviralen liposomalen Formulierung in erster Linie in der wässrigen Phase, in der Lipidphase oder in der wässrigen und der Lipidphase enthalten sein.

[0017] So gebildete mehrschichtige Liposome werden dann entweder in flüssigem Stickstoff ( $-170^{\circ}\text{C}$ ) oder in einem Gefriergerät ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) für mindestens eine Stunde gefroren, worauf sich eine Lyophilisierung mit einem Gefriertrockner (Lyophilisator) bei 25 mtorr mindestens über Nacht anschließt. Das resultierende Pulver wird in zwei aufeinanderfolgenden Schritten rehydratisiert: zuerst mit einer Zuckerlösung mit physiologischer Osmolarität (z. B. einer 300 mM Mannit- oder Glucose-Lösung) in einer Anteilmenge (z. B. 1/10) des Anfangsvolumens unter kräftigem Verwirbeln, gefolgt von einer Stabilisierungsruhe über einen Zeitraum von etwa 30 min bei Raumtemperatur; zweitens, das Volumen wird mit physiologischer Kochsalzlösung (154 mM NaCl-Lösung) auf das Anfangsvolumen gebracht, gefolgt von einem 10-minütigen Stabilisierungszeitraum bei Raumtemperatur. Das resultierende Liposom/Arzneimittel-Gemisch wird dann mit physiologischer Kochsalzlösung

5- bis 10-fach verdünnt und gegebenenfalls klassifiziert. Schließlich werden die nicht-klassifizierten Liposome und die klassifizierten Liposome zweimal bei  $250000 \times g$  für 30 min oder einmal bei  $370000 \times g$  für 45 min einer Ultrazentrifugation unterworfen. In beiden Fällen werden Pellets in geeigneten Volumina 10%iger Saccharose- oder 10%iger Trehalose-Lösung resuspendiert.

[0018] Zur Klassierung von Liposomen zur gewünschten Größe sind verschiedene Techniken verfügbar. Ein Klassierungsverfahren (sizing) ist die Homogenisierung, die auf Scherenergie beruht, um große Liposome in kleinere zu zerbrechen. In einem typischen Homogenisierungsverfahren werden mehrschichtige Vesikel durch einen Standardemulsionshomogenisator recycliciert, bis ausgewählte Liposomgrößen, typischerweise zwischen 0,1 und 0,5  $\mu\text{m}$  beobachtet werden. Extrudieren von Liposomen durch eine Polycarbonat-Membran mit kleinen Poren oder eine asymmetrische Keramikmembran unter Druck ist ebenfalls ein effektives Verfahren zur Reduzierung der Liposomengröße auf eine relativ gut definierte Größenverteilung. Typischerweise wird die Suspension ein- oder mehrmals durch die Membran geführt, bis die gewünschte Liposomengrößenverteilung erreicht ist. Die Liposome können erfolgreich durch Membranen mit kleineren Poren (z. B. von 1,0  $\mu\text{m}$  bis herunter zu 0,05  $\mu\text{m}$ , wenn dies gewünscht ist) extrudiert werden, um eine allmähliche Reduzierung der Liposomengröße zu erreichen. In einem beliebigen der Verfahren kann die Partikelgrößenverteilung durch herkömmliche dynamische Lichtstreuung überwacht werden.

[0019] Nach den angegebenen Schritten einer Hydratisierung des Lipidfilms, der Lyophilisierung, des fakultativen Extrudierens und der extraliposomalen Vidarabin-Abtrennung wird die Liposomen-Suspension bei  $-170^\circ\text{C}$  oder  $-70^\circ\text{C}$  gefroren und erneut unter denselben Bedingungen, die oben angegeben sind, lyophilisiert. Nach Wiederverdünnung der lyophilisierten Pulver, die unter Vakuum bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert wurden, mit sterilem deionisiertem Wasser auf die ursprüngliche Konzentration werden keine signifikanten Änderungen der Liposomen-Durchmesser beobachtet und mehr als 50% (für wasserlösliche Derivate) oder mindestens 90% (für lipophile Derivat) des ursprünglich eingeschlossenen Arzneimittels liegt in der liposomalen Form vor.

[0020] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung produziert ARA-AMP-Liposomenformulierungen mit einer hohen Einkapselungseffizienz bei einem niedrigem Anfangsverhältnis Arzneimittel : Lipid. In dieser Ausführungsform ist das Lipidgemisch Phosphatidylcholin : Cholesterol : Sterarylamin mit 10 : 5 : 3 bei einer Lipid-Konzentration von 17 bis 85 mM. Eine Hydratisierung erfolgt z. B. mit 0,6 bis 6,0 mg/ml ARA-AMP gefolgt von einem Gefrieren bei  $-170^\circ\text{C}$  oder  $-70^\circ\text{C}$  und Lyophilisierung. Eine Rehydratisierung zu einer Endosmolarität von 300 mosm/kg wird durch Zusatz von 300 mM Mannitlösung in einer Volumenmenge eines Zehntels der vorher verwendeten antiviralen Lösung, gefolgt von einem Auffüllen zum Endvolumen mit 154 mM NaCl, erreicht. Nach Verdünnung in physiologischer Salzlösung und Ultrafiltration, wie es oben beschrieben wurde, hat die fertige ARA-AMP-Formulierung einen Durchmesser, der im Bereich von 0,30  $\mu\text{m}$  bis 0,80  $\mu\text{m}$  liegt, der aber kleiner und homogener sein kann, wenn extrudiert wird; sie besitzt eine Einkapselungseffizienz von bis zu  $67,5 \pm 1,2\%$  und ein Arzneimittel/Lipid-Verhältnis von 19 bis 50 g/mol. Wie bei den anderen hierin beschriebenen Präparationen liegt das Arzneimittel vom äußeren Medium entfernt vor (im Gegensatz zu typischen Arzneimittel-Lipid-Konjugaten) und kann durch einen stärkeren Liganden nicht vom Liposom verdrängt werden, wie es in anderen Präparationen der Falls ein könnte.

[0021] Vidarabin (oder Vidarabin-Derivat)-Liposomenformulierungen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt sind, weisen Einkapselungseffizienzen von bis zu 100% ohne eine chemische Veränderung des eingeschlossenen Arzneimittels auf. Diese Formulierungen weisen eine hohe Stabilität entweder in lyophilisierter Form oder nach Rekonstitution auf, sind nicht toxisch und nicht immunogen, akkumulieren vorzugsweise in der Leber (entweder in Hepatozyten oder Kupferzellen) und Milz und weisen eine höhere pharmakologische Aktivität als das freie Arzneimittel auf.

[0022] Die verbesserten therapeutischen und pharmakokinetischen Effekte, die resultieren, stehen nicht notwendigerweise mit der Endmenge des Arzneimittels im Liposom/Arzneimittel-Gemisch in Beziehung, sondern mit der Tatsache, daß das Arzneimittel in einer Liposomenform vorliegt, die die hierin beschriebenen Charakteristika hat.

[0023] Die mit niedrigen Arzneimittel/Lipid-Verhältnissen erreichten Einkapselungseffizienzen zeigen, daß Vidarabin (oder Vidarabin-Derivat)-Liposomenformulierungen der Erfindung auch als therapeutische Mittel hochwirksam sind. In einem in vivo-Tiermodell von Waldmurmeltieren, die chronisch mit Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus (WHV) infiziert waren, bewiesen die Formulierungen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt worden waren, im Vergleich zum freien Arzneimittel eine höhere therapeutische Aktivität. Dieses ausgewählte Tiermodell wird von mehreren Autoren (Summers et al. 1978; Ponzetto et al. 1991) als ein Idealmodell für Forschungen an antiviralen Agenzien, die gegen HBV aktiv sind, angesehen. Die beobachteten Resultate zeigen, daß die hierin beschriebenen Vidarabin (oder Derivat)-Liposomenformulierungen den therapeutischen Index des Arzneimittels erhöhen und hochwirksame Agenzien in der Therapie von chronischer Hepatitis Typ B sind.

[0024] Vidarabin-Liposomenformulierungen der Erfindung können zusätzliche Substanzen enthalten, die dazu dienen, das Liposom und damit das antivirale Arzneimittel auf ein besonderes Gewebe oder eine besondere Zelle, z. B. auf Hepatozyten, zu richten wie auch die Halbwertszeit der Formulierung zu erhöhen. In diesen

Präparationen ist das antivirale Arzneimittel als Teil eines hierin beschriebenen Liposoms, allein oder in Verbindung mit einem Targetingmolekül, z. B. Galactosylterminierungsliganden oder monoklonale Antikörper, die z. B. an einen an der Hepatozytenoberfläche vorliegenden Rezeptor binden, eingearbeitet.

[0025] Die zu verabreichende Formulierung wird in jedem Fall eine Menge des Liposom/Vidarabin (oder Derivat)-Komplexes enthalten, die ausreicht, um bei dem Subjekt, das behandelt wird, die gewünschte therapeutische Wirkung zu erzielen. Die Erfindung stellt pharmazeutische Formulierungen zur parenteralen Verabreichung, vorzugsweise zur intravenösen Verabreichung, bereit, die einen Liposom/Viarabin (oder -Derivat)-Komplex mit physiologischer Osmolarität, suspendiert in einem annehmbaren Vehikel, wenn dies gewünscht wird, vorzugsweise in einem wässrigem Vehikel (z. B. 0,9% NaCl- oder 10% Saccharose-Lösung) umfassen. Diese Formulierungen können durch herkömmliche, gutbekannte Sterilisationstechniken sterilisiert werden oder können steril filtriert werden. Die Formulierungen können pharmazeutisch annehmbare Hilfssubstanzen enthalten, wenn dies verlangt wird, um die Qualität zu konservieren oder um eine Annäherung an physiologische Bedingungen zu erreichen, z. B. pH-einstellende und -puffernde Mittel, die Tonizität einstellende Mittel, Antioxidantien und andere Adjuvantien, z. B. Natriumacetat, Natriumlactat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Glucose,  $\alpha$ -Tocophörol. Aktuelle Verfahren zur Herstellung parenteral verabreichbarer Formulierungen sind dem Fachmann bekannt oder werden ihm einfallen und sind z. B. in Remingtons Pharmaceutical Sciences, 17. Ausgabe, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985) beschrieben.

[0026] Pharmazeutische Formulierungen der Erfindung können an Warmblütler, z. B. Menschen, die bereits an einer chronischen Hepatitis Typ-B-Infektion leiden, während eines ausreichend langen Zeitraums in einer ausreichenden Menge verabreicht werden, um das Fortschreiten der Infektion zu beenden oder deutlich zu hemmen. Mengen, die adäquat sind, um diese Wirkungen zu erreichen, werden als "therapeutisch wirksame Dosen" definiert. Mengen, die für diese Verwendung wirksam sind, werden von der Schwere der Infektion und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten, der behandelt wird, abhängen. Die Mengen werden im allgemeinen weniger als die sein, die typischerweise mit freiem Arzneimittel unter ähnlichen Umständen angewendet werden. Die Menge an Arzneimittel, die über die Liposom/Arzneimittel-Formulierungen der vorliegenden Erfindung verabreicht wird, kann über die erhöht werden, die typischerweise für freies Arzneimittel verwendet werden, und zwar infolge der Minimierung der Toxizität für den Patienten und der insgesamt erhöhten therapeutischen Wirksamkeit der Präparationen im Vergleich zu freiem Arzneimittel, wie es im Fall schweren, lebensbedrohlichen Infektionen notwendig sein könnte. Eine Bestimmung der tatsächlichen Menge der Liposom/Arzneimittel-Komplexe, die zur Behandlung eines besonderen Krankheitsbildes, wie es oben beschrieben wurde, notwendig sind, werden durch Standardverfahren, die dem Fachmann bekannt sind, ermittelt werden.

[0027] Die folgenden Beispiele für physikochemische und biologische Analysen, die mit den Vidarabin-Liposomenformulierungen, welche durch die erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden, durchgeführt wurden, sind lediglich zur Erläuterung, nicht zur Beschränkung aufgeführt.

#### Beispiele

[0028] Diese Beispiele erläutern eine Analyse von Vidarabin-Liposomenformulierungen, die wie oben beschrieben hergestellt wurden, wobei das verwendete Vidarabin-Derivat ARA-AMP war.

#### Einkapselung von Vidarabinmonophosphat (ARA-AMP) in Liposomen

[0029] Tabelle I zeigt die Wirkung einer Lipidzusammensetzung auf den Einbau von ARA-AMP in Liposome. Formulierungen wurden mit verschiedenen Lipidzusammensetzungen in einer relativen Lipidkonzentration von 17 mM und einem molaren Anfangsverhältnis Arzneimittel/Lipid von 1/10 unter Verwendung von sterilem entionisiertem Wasser als Rehydratisierungsmedium hergestellt. Die Einkapselungseffizienz (E. E.) bezeichnet das Verhältnis Arzneimittel/Lipid zum Schluß und Arzneimittel/Lipid zu Beginn und wird in Prozent ausgedrückt. Die prozentuale Wiedergewinnung bezeichnet das prozentuale Verhältnis von Arzneimittel- oder Lipidkonzentration am Ende zu der zu Beginn. Das Vorliegen von Cholesterol und geladenen Lipiden scheint die oben genannten Einkapselungsparameter zu beeinflussen. Cholesterol senkte die Fähigkeit der ARA-AMP-Einkapselung (Form. 2) die andererseits durch Einschluß von geladenen Lipiden in Liposomen begünstigt wurde (Form. 3 bis 9). Dieser letzte Effekt war vom Molenbruch des vorliegenden geladenen Lipids abhängig und für negative Phospholipide (PI und PG) wurde eine fast vollständige Sättigung der Vesikel bei einem molaren Verhältnis von 10 : 5 : 1 erreicht (**Fig. 1**). Positiv geladene Liposome, die durch Einschluß von SA erhalten wurden, wiesen eine viel höhere Beladungskapazität als negative und neutrale Liposome auf. In diesem Fall war die Einkapselungseffizienz stark vom SA-Gehalt abhängig, wobei sie mit Ansteigen des SA-Molenbruchs in den Liposomen bis zu  $81,6 \pm 7,4\%$  bei einem molaren Verhältnis (PC : CHOL : SA) von 10 : 5 : 3 anstieg. Bei diesem Verhältnis wurde ein Plateau erreicht, das anzeigt, daß die Vesikelsättigung erreicht war (**Fig. 1**). Das molare Verhältnis von 10 : 5 : 5 zeigte keine signifikante Erhöhung der ARA-AMP-Einfangwirksamkeit ( $86,6 \pm 6,8\%$ ). In keiner Dispersion wurden unlösliche, nichtliposomale, Lipid-Arzneimittel-Präzipitate beobachtet.

TABELLE I

Effekt der Lipidzusammensetzung auf Einkapselungsparameter von ARA-AMP in Liposomen

Formulierung Nr.	Lipid-Zusammensetzung (molares Verhältnis)	Di/Li (g/mol)	Df/Lf (g/mol)	Rückgewinnung (%)		E.E. (%)
				Lipid	ARA-AMP	
1	PC	37,6 ± 4,5	19,6 ± 2,8	87,0 ± 6,4	45,3 ± 3,9	52,1 ± 3,1
2	PC:CHOL (2:1)	33,6 ± 3,3	11,3 ± 2,0	93,6 ± 4,5	31,6 ± 4,8	33,9 ± 6,6
3	PC:CHOL:PI (10:5:1)	35,2 ± 1,6	17,5 ± 2,2	92,7 ± 2,5	45,8 ± 3,1	49,6 ± 4,7
4	PC:CHOL:PG (10:5:1)	35,3 ± 2,2	18,0 ± 0,8	85,7 ± 1,9	44,5 ± 2,3	51,2 ± 2,4
5	PC:CHOL:SA (10:5:1)	39,0 ± 2,1	20,8 ± 0,1	84,6 ± 6,3	45,0 ± 1,7	53,4 ± 2,9
6	PC:CHOL:PI (10:5:3)	37,1 ± 2,5	19,9 ± 1,1	85,1 ± 6,5	46,1 ± 7,5	54,0 ± 5,7
7	PC:CHOL:PG (10:5:3)	34,8 ± 0,4	21,5 ± 1,4	86,8 ± 5,8	53,4 ± 0,9	61,7 ± 3,4
8	PC:CHOL:SA (10:5:3)	38,4 ± 4,1	31,5 ± 5,8	84,6 ± 2,4	68,9 ± 5,4	81,6 ± 7,4
9	PC-CHOL:SA (10:5:5)	35,5 ± 1,2	30,9 ± 3,5	84,7 ± 11,7	73,3 ± 8,0	86,8 ± 6,8

[0030] Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  SD von mindestens drei Präparationen dar.

Di/Li: molares Anfangsverhältnis ARA-AMP/Lipid.

Df/Lf: molares Endverhältnis ARA-AMP/Lipid.

E. E.: Einkapselungseffizienz.

[0031] Um die Wirkung des Extrudierungsverfahrens auf die Einkapselungsparameter von ARA-AMP in Liposomen zu untersuchen, wurde eine Reihe von Experimenten unter Verwendung von Liposomen durchgeführt, die wie vorher beschrieben hergestellt worden waren, allerdings mit dem zusätzlichen Schritt der Klassierung durch Extrudieren vor Abtrennung des extraliposomalen Arzneimittels. Eine Rehydratisierung zu einer Endosmolarität von 300 mosm/kg wurde erreicht, indem 300 mM Mannit-Lösung in einem Zehntel des Volumens der verwendeten ARA-AMP-Lösung, gefolgt vom Auffüllen mit 154 mmol NaCl-Lösung zum Anfangsvolumen angewendet wurden. Liposome wurden durch Polycarbonat-Filter mit 800 nm (VET<sub>800</sub>) oder nacheinander durch Filtern mit 800 nm, 600 nm und 400 nm (VET<sub>400</sub>) extrudiert.

[0032] Eine direkte Beziehung zwischen Liposomengröße, Beladungskapazität und Einkapselungseffizienz wurde beobachtet (Tabelle II).



TABELLE II

Effekt des Extrudierens auf die Liposomengröße, die ARA-AMP-Beladungskapazität und die Einkapselungseffizienz

Liposom- typ	Mittlerer Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	Poly	Df/Lf (g/mol)	Rückgewinnung (%)		E.E. (%)
				Lipid	ARA-AMP	
DRV	0,59 $\pm$ 0,18	0,36 $\pm$ 0,12	19,2 $\pm$ 3,3	95,3 $\pm$ 4,0	59,2 $\pm$ 3,5	62,0 $\pm$ 1,2
VET800	0,48 $\pm$ 0,13	0,17 $\pm$ 0,03	15,9 $\pm$ 0,5	84,0 $\pm$ 2,0	37,3 $\pm$ 1,7	44,3 $\pm$ 1,3
VET400	0,30 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,05	13,7 $\pm$ 2,8	78,6 $\pm$ 4,8	31,9 $\pm$ 3,2	40,9 $\pm$ 5,7

Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  SD von mindestens drei Präparationen dar.

Di/Li: Molares Verhältnis ARA-AMP/Lipid zu Beginn. Die Df/Lf: Endgültiges molares Verhältnis ARA-AMP/Lipid.

DRV: Dehydratisierungs-Rehydratisierungs-Vesikel. VET: Vesikel erhalten durch Extrudieren.

E.E.: Einkapselungseffizienz: Poly: Polydispersitätsindex (ist ein Maß für die Liposomenhomogenität und liegt im Bereich von 0,0 für eine perfekt homogene bis 1,0 für eine vollständig inhomogene Dispersion).

[0034] **Fig. 2** zeigt den Effekt des molaren Anfangsverhältnisses ARA-AMP/Lipid auf das molare Endverhältnis ARA-AMP/Lipid und die Einkapselungseffizienz in Liposomen vom DRV-Typ, erhalten mit 17 mM Gesamtlipidkonzentration und Rehydratisierung des lyophilisierten Pulvers mit 300 mM Mannit-Lösung im ersten Schritt und 154 mM NaCl-Lösung im zweiten Schritt, wie es bereits beschrieben wurde.

[0035] Entweder für Liposomen des DRV-Typs oder Liposomen des VET-Typs, die unter denselben Bedingungen hergestellt worden waren, wurde die Menge an eingearbeitetem ARA-AMP erhöht, wenn das Anfangsverhältnis Arzneimittel/Lipid erhöht wurde, bis ein Plateau erreicht war. An diesem Punkt wurde eine Vesikelsättigung erreicht und die entsprechenden molaren Anfangsverhältnisse und molaren Endverhältnisse ARA-AMP/Lipid waren von der Lipidzusammensetzung und dem Liposomtyp abhängig (Tabelle III). Dagegen war die Einkapselungseffizienz in allen Fällen für niedrige molare Anfangsverhältnisse ARA-AMP/Lipid maximal und bei Ansteigen dieses Verhältnisses fiel die Einkapselungseffizienz auf kleinere Werte, die auch von Lipidzusammensetzung und dem Liposomtyp abhängt (Tabelle III). Die erhaltenen Resultate, zeigen, daß hohe Beladungskapazitäten und Einkapselungseffizienzen mit niedrigen molaren Verhältnissen Arzneimittel/Lipid für diese beispielhaften Liposomenformulierungen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten wurden, speziell für die, die Stearylamin enthalten, erreicht wurden.

TABELLE III

Molare Anfangsverhältnisse ARA-AMP/Lipid und molare Endverhältnisse ARA-AMP/Lipid und Einkapselungseffizienz, die einer Sättigung der Liposome entsprechen

Liposom- typ	Lipid- zusammen- setzung (molares Verhältnis)	Di/Li (g/mol)	Df/Lf (g/mol)	E. E. (%)
VET <sub>800</sub>	PC:CHOL:PI (10:5:1)	74	18	24
VET <sub>800</sub>	PC:CHOL:PG (10:5:1)	71	22	30
VET <sub>800</sub>	PC:CHOL:SA (10:5:1)	71	19	29
VET <sub>400</sub>	PC:CHOL:SA (10:5:3)	170	55	33
DRV	PC:CHOL:SA (10:5:3)	185	80	43

[0036]

Di/Li: molares Anfangsverhältnis ARA-AMP/Lipid.  
 Df/Lf: molares Endverhältnis ARA-AMP/Lipid.  
 DRV: Dehydratisierung-Rehydratisierungs-Vesikel.  
 VETx: Vesikel, erhalten durch Extrudieren durch Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von "x" nm.  
 E. E.: Einkapselungseffizienz.

#### Effekt der Lipidkonzentration auf die ARA-AMP-Einkapselung

[0037] Um die Einarbeitung von ARA-AMP in Liposome zu optimieren wurde der Effekt der Lipidkonzentration auf die Einkapselung des Arzneimittels in DRV und VET, bestehend aus PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3), untersucht. Eine Rehydratisierung zur der endgültigen Osmolarität von 300 mosm/kg wurde erreicht, indem 300 mM Mannit-Lösung in einem Zehntel des Volumens der verwendeten ARA-AMP-Lösung, gefolgt vom Auffüllen zum Anfangsvolumen mit 154 mM NaCl-Lösung, zugegeben wurden. Die Einkapselungseffizienz kann in signifikanter Weise verbessert werden, wenn die Lipidkonzentration auf 85 mmol ansteigt (Tabelle IV).

TABELLE IV

Effekt der Lipidkonzentration auf die Einkapselungseffizient von ARA-AMP in Liposomen<sup>a</sup>

Lipid- konzentration (mM)	Liposom- typ	Df/Lf (g/mol)	E.E. (%)
17	VET <sub>400</sub>	24,6 ± 2,6	36,0 ± 1,6
	DRV	36,5 ± 2,1	52,7 ± 0,6
85	VET <sub>400</sub>	29,0 ± 1,1	44,0 ± 1,7
	DRV	50,0 ± 0,5	67,5 ± 0,3

<sup>a</sup>Lipidzusammensetzung: PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3); molares Anfangsverhältnis ARA-AMP/Lipid: 2/10

[0038] Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert ± SD von mindestens drei Präparationen dar.

E. E.: Einkapselungseffizient.

Df/Lf: molares Endverhältnis RRA-AMP/Lipid.

## Stabilität von liposomalem Vidarabinmonophosphat in Salzlösung

[0039] Die Stabilität einer ausgewählten ARA-AMP-Liposomenformulierung in Kochsalzlösung wurde bei 4°C untersucht, um das Verhalten der Vesikel während der Lagerung, nach Rekonstitution zu beurteilen. Liposome vom VET<sub>400</sub>-Typ wurden mit 17 mM Lipidkonzentration mit Zusammensetzung PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3) hergestellt und die folgenden Aspekte wurden untersucht: (1) das Auftreten von Veränderungen in der Vesikelgröße; (2) Retention von eingeschlossenen Inhalten.

[0040] Während eines 52-tägigen Lagerungszeitraums bei 4°C unter Stickstoff zeigte die Formulierung keine signifikanten Änderungen in der mittleren Partikelgröße (Tabelle V). Nach 20 und 42 Tagen waren 83% bzw. 60% des anfänglichen intraliposalem ARA-AMP in der eingekapselten Form gehalten (Fig. 3).

TABELLE V

Stabilität von liposomalen ARA-AMP in Kochsalzlösung mit 4°C: Liposomendurchmesser

	0	Zeit (Tage)	
		20	52
Mittlerer Durchmesser (µm)	0,26 ± 0,07	0,28 ± 0,03	0,28 ± 0,02

[0041] Die angegebenen Werte sind der Mittelwert ± SD von mindestens drei Präparationen.

VET<sub>400</sub>-Lipidzusammensetzung: PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3). Lipidanfangskonzentration: 17 mM.

Molares Anfangsverhältnis ARA-AMP/Lipid: 1/10

## Stabilität von liposomalen Vidarabinmonophosphat in lyophilisierter Form

[0042] Die Stabilität einer ausgewählten ARA-AMP-Liposomenformulierung unter Lagerung in lyophilisierter Form bei 4°C im Vakuum wurde untersucht. Liposome (VET<sub>400</sub>) der Lipidzusammensetzung PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3) wurden wie vorher beschrieben erhalten, wobei außerdem der Schritt des Resuspendierens der Liposome in 10% Saccharose-Lösung enthalten war. Nach der Herstellung wurden Liposom-Suspensionen lyophilisiert. Nach Rekonstitution mit sterilem deionisiertem Wasser wurde physiologische Osmolarität erreicht und es wurden keine signifikanten Änderungen der Liposomendurchmesser beobachtet und mehr als 60% des zu Beginn eingeschlossenen ARA-AMP lag in der liposomalen Form vor.

TABELLE VI

Stabilität von lyophilisierten ARA-AMP-Liposomen<sup>a</sup> bei Lagerung bei 4°C unter Vakuum

Zeit (Monate)	Intraliposomale ARA-AMP- Retention (%)	Mittlerer Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	Poly <sup>b</sup>
0	100	0,32	0,14
0,25	65	0,33	0,14
0,5	NM	0,32	0,17
1	63	0,30	0,17
1,5	68	0,28	0,10
4,5	63	0,31	0,13
6	65	0,31	0,14
12	64	0,31	0,15

<sup>(a)</sup>Lipidzusammensetzung: PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3); molares Anfangsverhältnis ARA-AMP/Lipid: 1/10.<sup>(b)</sup>Polydispersitätsindex (im Bereich von 0,0 bis 1,0).[0043] Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  SD von mindestens drei Präparationen dar.

NM: nicht gemessen.

## In vivo-Toxizität

[0044] Leere Liposome (VET<sub>400</sub>) mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung (PC : CHOL : PI; PC : CHOL : PG; PC : CHOL : SA : alle in einem molaren Verhältnis 10 : 5 : 1) wurden wie vorher beschrieben erhalten und bezüglich Toxizität und Immunogenität beurteilt.

[0045] Weiblichen Mäusen, die zu Beginn des Experiments 6 bis 7 Wochen alt waren, wurden intraperitoneal Lipiddosen von 0,6 mmol/kg Körpergewicht 5 Tage in einer Woche während fünf aufeinanderfolgenden Wochen injiziert. In einer anderen Untersuchung, die mit identischen Tieren und Formulierungen durchgeführt wurde, wurden Liposomensuspensionen 4-mal in Dreiwochenintervallen injiziert, wobei die erste Injektion intraperitoneal war und die anderen intravenös waren. Die injizierten Dosen waren mindestens das 5-fache der entsprechenden Lipidmenge, die in therapeutischen Anwendungen eingesetzt wurde.

[0046] Die Tiere wurden entweder während des Verabreichungszeitraums oder zwei Wochen nach der letzten Injektion beobachtet und ihr Aussehen (einschließlich eventueller Läsionen an den Injektionsstellen) sowie Futter- und Wasseraufnahme wurden gemessen. Nach diesem Zeitraum wurden die Tiere ausbluten gelassen und es wurde eine makroskopische Beurteilung des allgemeinen Zustands der Abdomenorgane durchgeführt. Sera, die vor und nach den Injektionen gesammelt worden waren, wurden auf antiliposomale Komponenten IgG durch Mikropplatten ELISA-Technik untersucht, wobei als Antigen entweder die vollständige Zusammensetzung jeder Formulierung oder die einzelnen Komponenten verwendet wurden. Titer wurden als die Differenz zwischen dem log<sub>2</sub> des Kehrwerts der Antiserumverdünnung (zeigt dieselbe Extinktion wie 1/200-Verdünnung des Kontrollserums) und dem log<sub>2</sub> des Kehrwerts des 1/200-Kontrollserumverdünnung ausgedrückt.

[0047] In beiden Injektionsprotokollen zeigten die Tiere keinerlei Anzeichen von Toxizität und Nebenwirkungen, z. B. wurden kein anaphylaktischer Schock oder Tod beobachtet. 1 bis 2 Stunden nachdem eine Injektion der liposomalen Suspension erfolgt war, schienen die Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren weniger aktiv zu sein, allerdings wurde dieselbe Reaktion bei Mäusen beobachtet, denen nur Salzlösung injiziert worden war. Danach verhalten sich die Mäuse, die eine Injektion erhalten hatten vollständig normal. Nur die Tiere, die dem ersten Protokoll an Injektionen (intraperitoneal) unterzogen worden waren, wiesen an den Injektionsstellen einige Granulome im Abdomen auf. Diese Läsionen traten gleichzeitig (während der dritten Woche) bei den Tieren auf, denen die verschiedenen Liposomensuspensionen injiziert worden waren, und während der vierten Woche bei den Mäusen auf, denen nur Salzlösung injiziert worden war. Nach dem Töten der Tiere wurden die Organe sehr gut individualisiert ohne "adherences" oder Änderung in Farbe oder Gestalt. Läsionen waren nur eingegrenzt an den Injektionsstellen. Die Nahrungs- und Futteraufnahme war bei den Gruppen mit Liposomeinjektion und der unbehandelten Gruppe von Tieren sehr ähnlich.

[0048] Alle untersuchten Tiere zeigten sehr niedrige Antikörpertiter (im Bereich von 1 bis 7), die nur in einem

der fünf Tiere, die entweder Sa oder PG enthaltenden Liposomen immunisiert worden waren, und in zwei der fünf Tiere, die mit einer PI enthaltenden Formulierung immunisiert worden war, detektierbar. Diese Resultate zeigen, daß Liposome der untersuchten Zusammensetzungen in der Praxis nicht immunogen sind und in sicherer Weise als Träger für nichtmakromolekulare Arzneimittel, z. B. Vidarabin, Vidarabinmonophosphat oder irgendein anderes Vidarabin-Derivat, eingesetzt werden können.

[0049] In einer anderen Untersuchung, die an Waldmurmeltieren durchgeführt wurde, wurden den Tieren intravenös täglich an fünf aufeinanderfolgenden Tage ARA-AMP-Liposomenformulierung injiziert, die aus Liposomen des VET<sub>400</sub>-Typ mit einer Lipidzusammensetzung aus PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3) bestanden. Die injizierten Dosen lagen im Bereich von 0,07 bis 0,14 mmol/kg, ausgedrückt als Gesamtlipid, und im Bereich von 2 bis 4 mg/kg, ausgedrückt als Arzneimittel. Während der Behandlung und der nachfolgenden Zeiträume verhalten sich die Tiere normal und es wurden keine Nebenwirkungen festgestellt.

#### Bioverteilung von liposomalem Vidarabinmonophosphat

[0050] Die Bioverteilung einer ausgewählten ARA-AMP-Liposomen-Formulierung wurde mit Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 250–350 g untersucht. Liposome (VET<sub>400</sub>) mit der Lipidzusammensetzung PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3) wurden wie vorstehend beschrieben hergestellt, wobei [<sup>3</sup>H]-ARA-AMP verwendet wurde. Zu festgesetzten Zeiten (15 min; 1 h, 3 h) nach der intravenösen Injektion der radioaktiv markierten Liposome wurden die Radioaktivitäten im Blut, in der Leber, in der Milz und im Knochenmark gemessen. ARA-AMP-Liposomenformulierungen erreichten hohe Verweilzeiten des Arzneimittels im Blutstrom und eine hohe Arzneimittelabgabe an die Leber und die Milz, vermieden gleichzeitig eine Abgabe an das Knochenmark. Bezüglich der injizierten Dosis war die Radioaktivität im Blut  $32,8 \pm 18,9\%$  bei 15 min, nahm langsam im Lauf der Zeit ab und war nach drei Stunden  $16,2 \pm 3,9\%$ . Die Akkumulierung in der Leber war nach 15 min ( $21,2 \pm 4,6\%$ ) maximal. Nach dieser Zeit nahm die akkumulierte Arzneimittelmenge infolge der hohen metabolischen Aktivität dieses Organs ab, blieb aber infolge eines Gleichgewichts zwischen der Arzneimittelabgabe und der metabolischen Aktivität zwischen 1 und 3 Stunden konstant ( $13,7 \pm 6,5\%$ ). Die Akkumulierung von ARA-AMP wurde entweder in Hepatozyten oder in Kupferzellen detektiert. Endothelialzellen trugen zu der gesamten Leberaufnahme nicht bei. Die Akkumulierung in der Milz war niedriger als in der Leber und wegen der geringen Aufnahmekapazität dieses Organs im Vergleich zu Leber nur maximal eine Stunde ( $8,8 \pm 1,5\%$ ) und blieb praktisch bis 3 Stunden konstant ( $7,7 \pm 2,2\%$ ). Eine Akkumulierung im Knochenmark war praktisch Null, wobei nur 0,5% der injizierten Dosis bei 15 Minuten nachweisbar war und derselbe Prozentgehalt bei 3 Stunden nachweisbar war.

#### Pharmakologische Aktivität von Liposomen-Vidarabinmonophosphat

[0051] Um die therapeutische Wirksamkeit einer ausgewählten Vidarabinmonophosphat-Liposomenformulierung, die gemäß der vorliegenden Erfindung produziert worden war, zu beurteilen, wurde ein Tiermodell für chronische Hepatitis entwickelt, in dem Waldmurmeltiere, die chronisch mit Waldmurmeltier-Hepatitisvirus (WHV) infiziert waren, verwendet wurden. Eine ARA-AMP-Liposomenformulierung wurden durch Liposome des VET<sub>400</sub>-Typs mit der Lipidzusammensetzung PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3) gebildet.

[0052] Tieren wurde intravenös als Bolus über fünf aufeinanderfolgende Tage im 24-Stunden-Abstand die Formulierung intravenös injiziert. Blutproben wurden vor, während und nach der Behandlung entnommen. Ein Ausbluten wurde durchgeführt, während die Waldmurmeltiere unter Anästhesie waren, welche mit Ketaminhydrochlorid induziert worden war. WHV-DNA wurde durch Dot-Blot-Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-markierter Sonde eines geklonten Gesamt-WHV-Genoms (ein Geschenk von Dr. J. L. Gerin, Georgetown Univ., Maryland, USA), gefolgt von einer Autoradiographie, gemessen. Fünffach-Verdünnungen aller Seren aus einer einzelnen Behandlung wurden analysiert und die Resultate wurden als Umkehrwert der höchsten Serumverdünnung, die ein Autoradiographiesignal liefern, ausgedrückt.

[0053] Pharmakologische Beurteilungsergebnisse zeigten, daß die antivirale Aktivität von ARA-AMP durch Liposomeneinkapselung stark verbessert wurde. Es wurde eine deutliche Reduktion der WHV-DNA-Replikation nach Behandlung bei deutlich niedrigerer Dosis als die des freien Arzneimittels (**Fig. 4**) beobachtet.

[0054] Aus den Resultaten wurde der Schluß gezogen, daß die pharmakologische Aktivität durch Vidarabinmonophosphat-Liposomenformulierungen, die erfindungsgemäß produziert wurden, stark erhöht war, was ihre Verwendbarkeit in der klinischen Behandlung bestätigt. Auf diese Weise stellen diese Formulierungen einen vielversprechenden Ansatz dar, um die inhärenten Probleme, die mit der Verwendung von Vidarabin in der Therapie verbunden sind, mittels Erhöhung der Konzentration an den Wirkstellen und Reduzierung der therapeutischen Dosis zu lösen.

## Beschreibung der Figuren

**[0055] Fig. 1**

zeigt den Effekt der Lipidzusammensetzung bei der ARA-AMP-Einkapselung in Liposomen (DRV). Fehlerbalken geben die SD von mindestens drei Präparationen an. Molares Anfangsverhältnis ARA-AMP/Lipid: 1/10. Gesamtlipidkonzentration: 17 mM. Rehydratisierungsmedium: entionisiertes Wasser.

**[0056] Fig. 2**

zeigt die Variation der Einkapselungseffizienz und das endgültige Verhältnis ARA-AMP/Lipid als Funktion der verwendeten Anfangsverhältnisse Arzneimittel/Lipid. Liposome (DRV) mit einer Lipidzusammensetzung PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3) wurden unter Verwendung einer Konzentration an Gesamtlipid von 17 mM hergestellt.

**[0057] Fig. 3**

zeigt die Stabilität einer ausgewählten ARA-AMP-Liposomenformulierung, bestehend aus Liposomen VET<sub>400</sub> mit der Lipidzusammensetzung PC : CHOL : SA (10 : 5 : 3) in Kochsalzlösung bei 4°C.

**[0058] Fig. 4**

zeigt die antivirale Aktivität von freiem und liposomalen ARA-AMP in Waldmurmeltieren, die chronisch mit dem Waldmurmeltier-Hepatitisvirus infiziert waren.

## Literaturstellen

- [0059] Ayoola, E. A. et al., *Bulletin of the WHO*, 66 (1988) 443–455.
- [0060] Buchanan, R. A., Kinkel, A. W., et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 27 (1980) 690–696.
- [0061] Fiume, L., Mattioli, A., et al., *FEBS Lett.*, 116 (1980) 185–188.
- [0062] Fiume, L., Busi, C., et al., *FEBS Lett.*, 129 (1981) 261–264.
- [0063] Fiume, L., Mattioli, A. et al., *Experientia*, 38 (1982-a) 1087–1089.
- [0064] Fiume, L., Busi, C., et al., *FEBS Lett.*, 146 (1982-b) 42–46.
- [0065] Fiume, L., Bassi, B., et al., *Pharm. Acta Helv.*, 60 (1985) 378–320.
- [0066] Fiume, L., Bassi, B., et al., *Biochem. Pharmacol.*, 35 (1986-a) 967–972.
- [0067] Fiume, L., Bassi, B., et al., *FEBS Lett.*, 203 (1986-b) 203–206.
- [0068] Fiume, L., Busi, C., et al., *Cancer Drug. Del.*, 4 (1987) 145–150.
- [0069] Fiume, L., Bassi, B., et al., *Pharm. Acta Helv.*, 63 (1988-a) 137–139.
- [0070] Fiume, L., Busi, C., et al., *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 4 (1988-b) 265–284.
- [0071] Fiume, L., Bonino, F., et al., *Lancet*, 2 (1988-c) 13–15.
- [0072] Fiume, L., Betts, C. M., et al., *J. Hepatol.*, 15 (1992) 314–322.
- [0073] Gerin, J. L., *Cur. Opin. Inf. Dis.*, 5 (1992) 806–810.
- [0074] Gephart, G. F. und Lerner, A. M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 19 (1981) 170–178.
- [0075] Gregoriadis, G. und Florence; A. T., *Drugs*, 45 (1993) 15–28.
- [0076] Guardia, J., Esteban, R., et al., *Liver*, 6 (1986) 118–122.
- [0077] Guillevin, L., Lhote, F., et al., *J. Rheumatol.*, 20 (1993) 289–298.
- [0078] Guise, V., Drouin, J. -Y., et al., *Pharm. Res.*, 7 (1990) 736–741.
- [0079] Hwang, K. J., *Liposome pharmacokinetics*. In Ostro, M. J. (Herausg.), *Liposomes: from biophysics to therapeutics*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, S. 109–156.
- [0080] Kanterewick, E., Bruguera, M. et al., *J. Clin. Gastroenterol.*, 12 (1990) 90–92.
- [0081] LePage, G. A., Lin, T. -T., et al., *Cancer Res.*, 32, (1972) 2441–2444.
- [0082] Lok, A., *JAMA*, 11 (1990) 713
- [0083] Lopez-Berestein, G., Bodey, G., et al., *Arch. Intern. Med.*, 149 (1989) 2533–2536.
- [0084] Lunel-Fabiani, F., *Rev. Prat.*, 41 (1991) 315–323.
- [0085] Marcellin, P., Ouzan, D., et al., *Hepatology*, 10 (1989) 328–331.
- [0086] Marcellin, P., *Rev. Prat.* 41 (1991) 1149–1155.
- [0087] Mayhew, E., Lazo, R. und Vail, W. J., *Preparation of liposomes entrapping cancer chemotherapeutic agents for experimental in vivo and in vitro studies*. In Gregoriadis G. (Herausg.), *Liposome Technology*, Bd. II, CRC Press, Boca Raton, 1984, S. 19–31.
- [0088] Perez-Soler, R., *Cancer Treat. Rev.*, 16 (1989) 67–82.
- [0089] Ponzetto, A., Fiume, L., et al., *Hepatology*, 14 (1991) 16–24:
- [0090] Poste, G., Kirsh, R. and Koestler, T., *The challenge of liposome targeting in vivo*. In Gregoriadis, G. (Herausg.), *Liposome Technology*, Bd. III, CRC Press Inc., Florida, 1984, S. 1–28.
- [0091] Renoldi, A., Maraschin, R., et al., *4-Week intravenous toxicity study in Cynomolgus monkeys treated with L-HSA-ara-AMP*. RBM, Istituto di Ricerche Biomediche Antoine Marxer, Ivrea, Italien (1990) Exp. Nr. 890520.
- [0092] Sacks, S. L., Scullard, G. H., et al., *Antim. Ag. Chemother.* 21 (1982) 93–100.
- [0093] Schabel Jr., F. M., *Chemotherapy*, 13 (1968) 321–338.

- [0094] Sculier, J. -P., Coune, A., et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24 (1988) 527–538.
- [0095] Scullard, G. H., Pollard, R. B., et al., J. Infect. Dis., 143 (1981) 772–783.
- [0096] Shannon, W. M., Adenine arabinoside: antiviral activity in vitro. In Paran-Langston, D., Buchanan, R. A. and Alford, C. A. Jr. (Herausg.), Adenin arabinoside: an antiviral agent, Raven Press, New York, 1975, S. 1–43.
- [0097] Sherphof, G. L., Roerdink, F., et al., Biol. Cell., 47 (1983) 47–58.
- [0098] Smith, C. I., Kitchen, L. W., et al., JAMA, 247 (1982) 2261–2265.
- [0099] Szoka Jr., F. C., Biotech. Applied Biochem., 12 (1990) 496–500.
- [0100] Tiollais, P., Dejean, A., et al., Méd. ISci, 6 (1990) 96–97.
- [0101] Thomas, H. C., Treatment of hepatitis B viral infection. In Zuckerman, A. J. (Herausg.), Viral hepatitis and liver disease. Alan R. Liss, New York, 1988, S. 817–822.
- [0102] Trepo, C., Ouzan, D., et al., J. Hepatol., 3 (Ergänzung 2) (1986) S97–S105.
- [0103] Weller, I. V. D., Lok, A. S. F., et al., Gut, 26 (1985) 745–751.
- [0104] Weller, I. V. D., J. Hepatol., 3 (Ergänzung 2) (1986) S107–110.
- [0105] Whitley, R., Alford, C., et al., Drugs, 20 (1980-a) 267–282.
- [0106] Whitley, R. J., Tucker, B. C., et al., Antimicrob. Ag. Chemother., 18 (1980-b) 709–715.
- [0107] Yokosuka, O., Omata, M., et al. Gastroenterology, 89 (1985) 246–251.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat), die geeignet sind für Verabreichung zu einem Säugetieren, umfassend:  
ein mehrschichtig Liposomenformulierung aus Vidarabin (oder ein Derivat davon) aus ein wässrig Lösung und ein Lipidschichtgemisch, ein Bestandteil mit elektrisch Ladung enthaltend oder nicht, herstellen;  
die Liposomvidarabin (oder Derivat davon) gefriertrocknen; die gefriertrocknet Liposomvidarabin (oder ein Derivat davon) zu einem schließlich physiologische Osmolarität, erst in ein nicht salzhaltig Lösung von etwa physiologische Osmolarität rehydratisieren; und  
die Liposomvidarabin (oder Derivat davon) mit eine physiologische verträgliche salzhaltig Lösung wieder rehydratisieren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend der Schritt von die rehydratisiert Liposomenformulierung aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) durch Extrusion über eine durchlässige Membrane herabsetzen.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Liposomenformulierung aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) unter Druck durch eine 0,8 µm Membrane extrudiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Liposomenformulierung aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) unter Druck durch 0,8 µm, 0,6 µm und 0,4 µm Membranen nacheinander extrudiert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die erhaltend Liposomenformulierung aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) ein Durchmesser zwischen etwa 0,3 µm und 5,0 µm hat.
6. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die erhaltend Liposomenformulierung aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) ein Durchmesser zwischen etwa 0,3 µm und 0,7 µm hat.
7. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die erhaltend Liposomenformulierung aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) ein Durchmesser zwischen etwa 0,2 µm und 0,4 µm hat.
8. Verfahren nach Ansprüche 3 und 4, wobei die in die Liposomen nicht aufgenommen Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) vor oder nach der Extrusionschritt ganz entfernt ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Konzentration der Lipidgemisch in der lipidisch Film 10 mM bis zu 100 mM ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Konzentration der Lipidgemisch in der lipidisch Film 17 mM bis zu 85 mM ist.
11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein lipidisch Bestandteil von der lipidisch Filmgemisch ein geladen Molekül hat.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei ein lipidisch Bestandteil der lipidisch Filmgemisch ein positiv Ladung hat und einwirken auf Vidarabin (oder ein Derivat davon) kann.
13. Verfahren nach Anspruch 11, wobei ein Lipidbestandteil der lipidisch Filmgemisch ein negativ Ladung hat und einwirken auf Vidarabin (oder ein Derivat davon) kann.
14. Verfahren nach Anspruch 12, wobei für Verkapselung der Vidarabinmonophosphat (ARA-AMP) der Konzentration der positiv Molekül mindestens 6% ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei für Verkapselung der Vidarabinmonophosphat (ARA-AMP) die Konzentration der positiv Molekül ca. 17% ist.
16. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die lipidisch Filmgemisch, in ein Verhältnis zwischen 0,01 bis 10: Cholesterol (CHOL), Phosphatidylcholin (PC), hydriert Phosphatidylcholin (HPC), Distearoylphosphatidylcholin (DSPC), Sphingomyelin (SM), Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), Dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG), Phosphatidylglycerol (PG), Dimirystoylphosphatidylcholin (DMPC), Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Ganglioside, Ceramide, Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidinsäure (PA), Dicetylphosphat (DcP), Dimirystoylphosphatidylglycerol (DMPG), Stearylamin (SA), Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) und jeder beliebiger synthetisch Lipid einschliesst.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die lipidisch Filmgemisch ein Glycerophospholipid gewählt aus der Gruppe Phosphatidylcholin, Dimirystoylphosphatidylcholin, Dipalmitoylphosphatidylcholin einschliesst; wobei ein Sterol, wie Cholesterol ist gegebenenfalls vorliegend; und ein lipidisch oder nicht lipidisch geladen Molekül (Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerol, Stearylamin); mit jeder Bestandteil der Liposomenpräparat wenn vorliegende in ein relativ Verhältnis von 40–70%, 10–50% bzw. 5–25%.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei für Verkapselung der Vidarabinmonophosphat (ARA-AMP) die lipidische Bestandteile aus Phosphatidylcholin : Cholesterol : Stearylamin ein Molverhältnis von etwa 10 : 5 : 3 aufweisen.
19. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die gefriertrocknet Liposomenvidarabin (oder ein Derivat davon) rehydriert in ein Dextrose-, Galactose-, Manit-, Sucrose- oder ander Zuckerlösung wird, in eine Konzentration genügend für eine physiologische Osmolarität erzuhalten.
20. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die physiologische verträgliche Salzlösung in der schließlich rehydrierung Schritt ein NaCl 0,9% Lösung ist.
21. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die wäßrige Lösung daß für Herstellung die mehrschichtig Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Derivat davon) eingesetzt wird eine Konzentration aus Vidarabin, Vidarabinmonophosphat oder einander Vidarabinderivat von 0,06 mg/ml bis 8 mg/ml enthält.
22. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Lipidfilm ein Vidarabinderivat einschliesst.
23. Verfahren nach Anspruch 21, wobei der Vidarabinderivat Vidarabinmonophosphat (ARA-AMP) ist.
24. Verfahren nach Anspruch 21, 22 und 23, dadurch gekennzeichnet daß Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) mit ein Verkapselungswirksamkeit bis zu 100% hergestellt sind.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet daß Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) die ein Stabilität in Salzlösung bei 4°C höher als 50% aufweisen und die Eigenschaften der Liposomen nach 45 Tagen Inkubationszeit erhalten hergestellt werden.
26. Verfahren nach Ansprüche 1, 2 und 8, einschließend noch die Liposomen in 10% Sucrose oder 10% Trehalose Lösungen oder in eine isotonisch Lösung von anderen Zucker nach entfernen der extraliposomale Wirkstoff wieder in Suspension bringen.
27. Verfahren nach Anspruch 26 einschließend noch wieder der Schritt von Gefriertrocknung der Liposomensuspension.
28. Verfahren nach Anspruch 27, gekennzeichnet durch die Vorbereitung von Liposomenformulierungen,



mit einer hohen Stabilität unter gefriertrocknender Form in Beziehung auf die Morphologie und intraliposomale Zurückbehaltung der Arzneimittel.

29. Verfahren nach Anspruch 28, gekennzeichnet durch die Vorbereitung von Liposomenformulierungen, die nach Wiederherstellung mit steriler, entionisiertem Wasser des gefriertrocknen Pulvers, daß 1 Jahr unter Vakuum, bei 9°C gelagert ist, keine bedeutungsvollen Wandlungen des Liposomendurchmessers beobachtet wird und mehr als 50% (für wasserlösliche Vidarabinderivate) oder mindestens 90% (für lipophilische Derivate) von den anfangs gefangenen Wirkstoff in liposomischer Form ist.

30. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die zu einem Patient verabreichten Liposomenformulierungen ARA-AMP nichtgiftig und nichtimmunogenisch ist.

31. Verfahren nach Anspruch 23, wo die ARA-AMP Liposomenformulierungen der Verweilzeit der Wirkstoff in Blutkreislauf verlängert, wenn sie dem Patient i. v. injiziert wird.

32. Verfahren nach Anspruch 23, wo die ARA-AMP Liposomenformulierungen sich hauptsächlich in die Leber (in großem Umfang) und Milz sammeln, wenn sie dem Patient i. v. injiziert wird.

33. Verfahren nach Anspruch 23, wo die Liposomenformulierungen ARA-AMP sich in Hepatozyten und Kupfer Zelle sammeln, wenn sie dem Patient i. v. injiziert wird.

34. Verfahren nach Anspruch 23, gekennzeichnet durch die Herstellung von Liposomenformulierungen ARA-AMP mit einer erhöhten therapeutischen Zahl im Vergleich mit der freien Wirkstoff.

35. Verfahren nach Anspruch 23, gekennzeichnet durch die Herstellung von Liposomenformulierungen ARA-AMP mit einer erhöhten therapeutischen Wirkung wenn sie zur Behandlung von chronischer B Hepatitis oder andere Krankheiten, wo sie therapeutisch wirksam sind, verwendet werden im Vergleich mit der freien Wirkstoff

36. Liposomenformulierung, die für die Verabreichung am Säugetier geeignet ist, hergestellt nach einem der Ansprüche 1–35, umfassend Vidarabin, Vidarabinmonophosphate oder andere Vidarabinderivat, gekennzeichnet durch eine Wirkstoffkonzentration zwischen 0,06 mg/ml und 6 mg/ml und eine Lipidkonzentration zwischen 17 mM und 85 mM.

37. Vidarabin Liposomenformulierung (oder ein Vidarabinderivat) nach Anspruch 36, wobei die Liposomen einen Durchmesser zwischen 0,01 µm und 5,0 µm aufweisen.

38. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Anspruch 36, wobei die Lipidbestandteil, in einem Verhältnis zwischen 0,01 bis 10: Cholesterol (CHOL), Phosphatidylcholin (PC), hydriertes Phosphatidylcholin (HPC), Distearoylphosphatidylcholin (DSPC), Sphingomyelin (SM), Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), Dioleoylphosphatidylcholin (DOPG), Phosphatidylglycerol (PG), Dimiristoylphosphatidylcholin (DMPC), Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Ganglioside, Ceramide, Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidinsäure (PA), Dicetylphosphat (DcP), Dimiristoylphosphatidylglycerol (DMPG), Stearylamin (SA), Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) und jedes beliebige synthetische Lipid darstellt.

39. Liposomenformulierung aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Anspruch 36, wobei die Lipidbestandteil einschließt ein Glycerophospholipid ausgewählt aus Phosphatidylcholin, Dimiristoylphosphatidylcholin, Dipalmitoylphosphatidylcholin; ein Sterol wie Cholesterol, gegebenenfalls vorliegend; und eine lipidsche oder nichtlipidsche geladene Molekül (Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerol, Stearylamin), worin jeder Bestandteil aus der Liposomenvorbereitung, wenn vorliegend, eine relative Verhältnis zwischen 40–70%, 10–50% bzw. 5–25% beträgt.

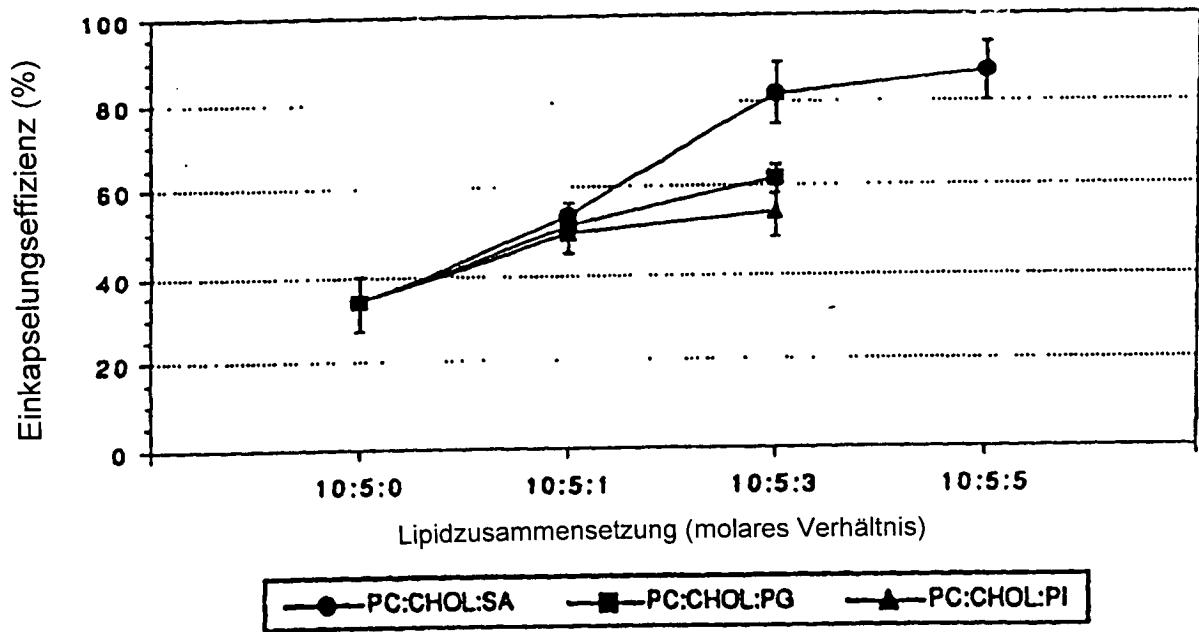
40. Liposomenformulierung nach Anspruch 39, wobei der lipidsche Bestandteil für die Verkapselung der Vidarabinmonophosphat (ARA-AMP) Phosphatidylcholin : Cholesterol : Stearylamin in einem relativen Verhältnis zwischen 40–70%, 10–50% bzw. 5–25% einschließt.

41. Liposomenformulierung nach Anspruch 40, wobei für Verkapselung der Vidarabinmonophosphat (ARA-AMP) die lipidsche Bestandteilen aus Phosphatidylcholin: Cholesterol : Stearylamin in einem Molverhältnis von etwa 10 : 5 : 3 vorhanden sind.

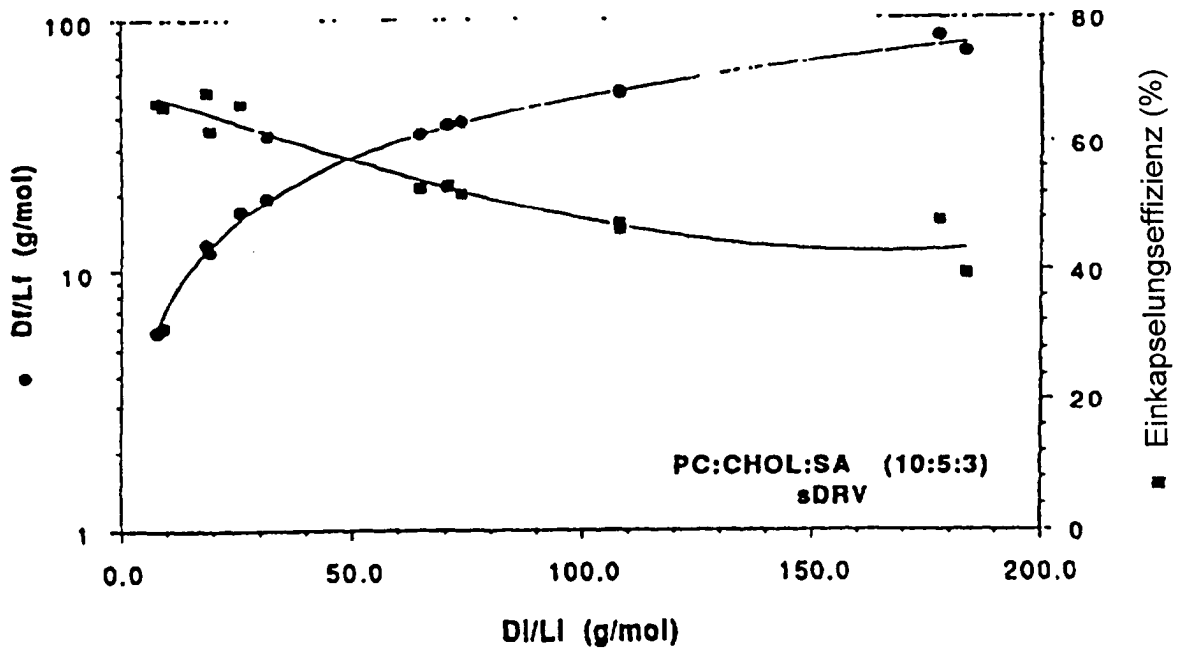
42. Liposomenformulierungen nach Anspruch 40, wobei die Konzentration der positiv Molekül (als relativ Lipid Molverhältnis) mindestens 15% beträgt.
43. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Anspruch 36, daß nahezu physiologische Osmolarität hat.
44. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Anspruch 36, wobei der Vidarabinderivat Vidarabinmonophosphat (ARA-AMP) ist.
45. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Ansprüche 36–44, daß nicht-giftig und nichtimmunogenisch ist.
46. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Ansprüche 36–44, dadurch gekennzeichnet daß sie ein erhöhten Verweilenzeit ins Blutkreislauf in Vergleich zu die freie Wirkstoff aufweist.
47. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Ansprüche 36–44, dadurch gekennzeichnet daß sie hauptsächlich in die Leber (in großen Umfang) und Milz sich ansammelt.
48. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Ansprüche 36–44, dadurch gekennzeichnet daß die Wirkstoff in die Leber und Milz sich ansammelt in höher Menge als die freie Wirkstoff.
49. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Ansprüche 36–44, dadurch gekennzeichnet daß sie niedrig Gehalt der Wirkstoffen ins Knochenmark erzeugt als die freie Wirkstoff.
50. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Ansprüche 36–44, dadurch gekennzeichnet daß sie sich in Hepatozyten und Kupffer Zelle sammeln.
51. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Ansprüche 36–44, dadurch gekennzeichnet daß sie in höher Menge in Leberzellen ansammelt als die freie Wirkstoff.
52. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Ansprüche 36–44, dadurch gekennzeichnet daß sie ein erhöhten Therapeutikzahl als die freie Wirkstoff hat.
53. Liposomenformulierungen aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) nach Ansprüche 36–44, dadurch gekennzeichnet daß sie ein verbessert therapeutisch Wirkung zur Behandlung von Typ B chronisch Hepatitis oder von anderen Erkrankungen für denen sie therapeutisch Wirkung aufweist, als die freie Wirkstoff.
54. Verwendung der Liposomenformulierungen nach einem der Ansprüche 36–53 zur Herstellung ein Arzneimittel für ein neue ärzlich Behandlung, wobei ein therapeutisch wirkend Menge aus ein Liposomformulierung aus Vidarabin (oder ein Vidarabinderivat) eingesetzt wird.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

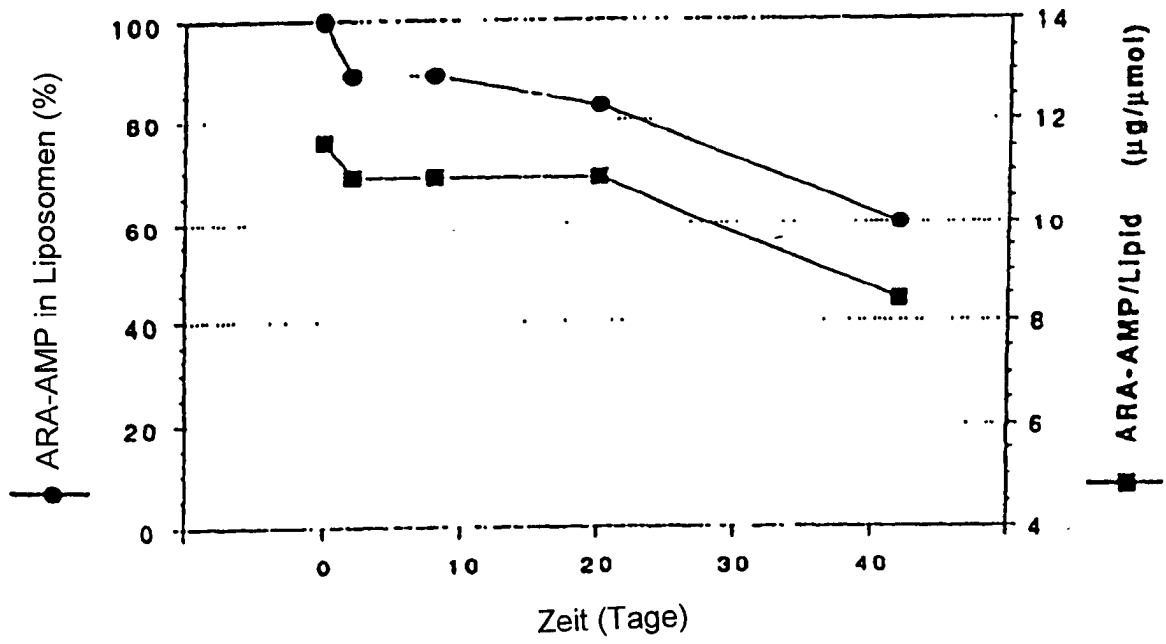
Anhängende Zeichnungen



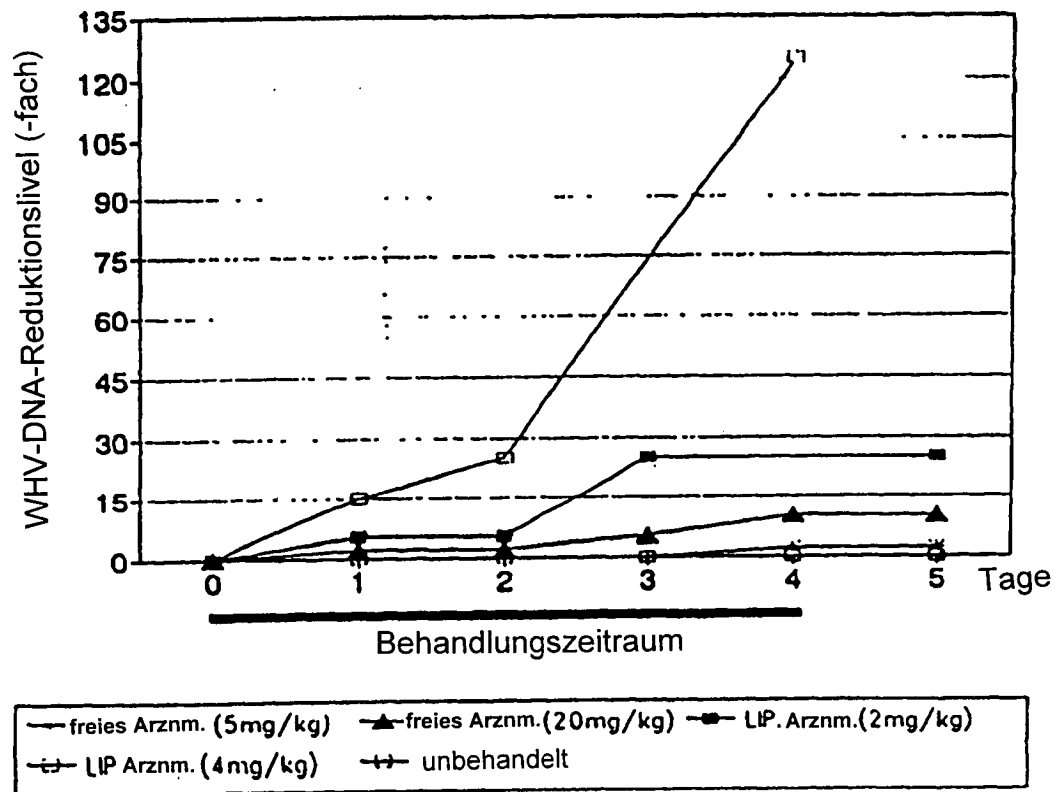
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4