

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. April 2011 (07.04.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2011/039144 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
*A61K 9/127* (2006.01) *C07D 495/04* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/064272
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
27. September 2010 (27.09.2010)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2009 043 342.2  
29. September 2009 (29.09.2009) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **EGGER, Holger** [DE/DE]; Kniprodestr. 31, 51067 Köln (DE). **EBLE, Axel** [DE/DE]; Greifswalder Str. 38, 10405 Berlin (DE). **LIEBSCHER, Juergen** [DE/DE]; Am alten Friedhof 51, 12524 Berlin (DE). **HERRMANN, Andreas** [DE/DE]; Wilhelm-Wolff-Str. 25a, 13159 Berlin (DE). **LOEW, Martin** [DE/DE]; Warschauer Str. 27, 10243 Berlin (DE). **ARBUZOVA, Anna** [RU/DE]; Lutherstr. 18, 12167 Berlin (DE). **BRODERSEN, Nicolai** [DE/DE]; Erich-Weinert-Str. 140, 10409 Berlin (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH**; Law and Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SUBSTANCES CONTAINING DISULFIDE GROUPS FOR SELF-ASSEMBLY CARRIERS FOR CONTROLLED RELEASE OF AN ACTIVE INGREDIENT

(54) Bezeichnung : DISULFIDGRUPPEN ENTHALTENDE STOFFE FÜR SELBSTORGANISIERTE TRÄGER ZUR KONTROLLIERTEN FREISETZUNG EINES WIRKSTOFFS

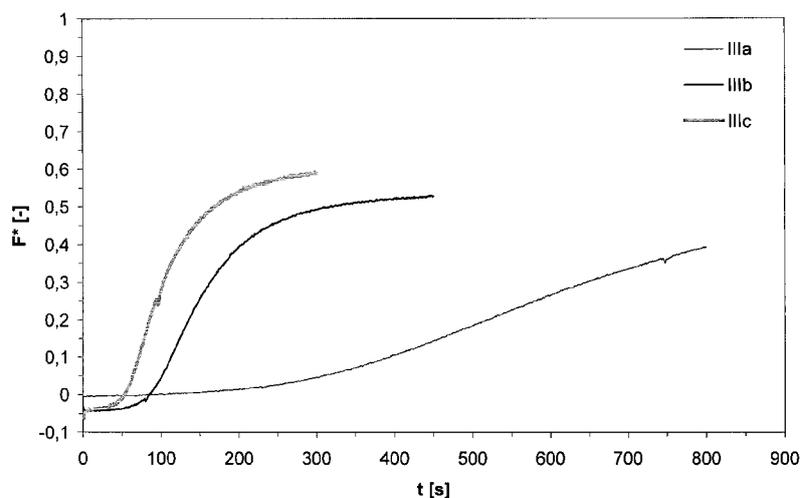


Fig. 2

(57) Abstract: The present invention relates to novel substances for production of self-assembly active ingredient carriers in the form of a liposome comprising a disulfide group for controlled release of an active ingredient present therein, and to a method for releasing active ingredients using the aforementioned carrier.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Stoffe zur Herstellung selbstorganisierter Wirkstoffträger in Form eines Liposoms umfassend eine Disulfidgruppe zur kontrollierten Freisetzung eines hierin enthaltenen Wirkstoffs, sowie ein Verfahren zur Freisetzung von Wirkstoffen unter Verwendung des vorgenannten Trägers.

WO 2011/039144 A1

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

## DISULFIDGRUPPEN ENTHALTENDE STOFFE FÜR SELBSTORGANISIERTE TRÄGER ZUR KONTROLLIERTEN FREISETZUNG EINES WIRKSTOFFS

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Stoffe zur Herstellung selbstorganisierter Wirkstoffträger in Form eines Liposoms umfassend eine Disulfidgruppe zur kontrollierten Freisetzung eines hierin enthaltenen Wirkstoffs, sowie ein Verfahren zur Freisetzung von Wirkstoffen unter Verwendung des  
5 vorgeannten Trägers.

Trägersysteme zur Wirkstofffreisetzung basierend auf Liposomenträgern in der Größe von etwa 100 nm sind im Allgemeinen mittlerweile in der medizinischen Technik bekannt. Sie werden im Allgemeinen als vorteilhaft angesehen, wenn eine für bestimmte Organe giftige Substanz, welche aber an anderen Orten des menschlichen Körpers als medizinischer Wirkstoff eingesetzt werden kann, nur  
10 an jenen gewünschten Stellen freigesetzt werden soll.

Des weiteren kann es im Zuge des Transports des Wirkstoffes zum Wirkort zu einer Zersetzung oder Inaktivierung des Wirkstoffes etwa durch Abbau oder Angriff durch das Immunsystem kommen, so dass solche Trägersysteme auch in dieser Hinsicht als vorteilhaft anzusehen sind, wenn sie den Wirkstoff auf dem Weg zum Wirkort vor vorzeitiger Freisetzung oder Zersetzung schützen.

15 Unter den vorgeannten Liposomenträgern wird im Allgemeinen eine Stoffgruppe verstanden, welche aus nicht giftigen Phospholipiden besteht. Häufig werden in solche Liposomenträger auch Polymere, wie etwa Polyethylenglykole eingebunden, welche sich durch eine verbesserte Stabilität im Blutkreislauf von behandelten Patienten auszeichnen, da die vorgeannten Polyethylenglykole eine Form sterischen Schutzes um die eigentlichen Liposomenträger bilden. Man erhält sogenannte  
20 Lipopolymere.

Die vorgeannten Aussagen bezüglich Liposomenträgern werden auch durch J. Davidsen et al. in „Secreted phospholipase A2 as a new enzymatic trigger mechanism for localised liposomal drug release and absorption in diseased tissue“ erschienen in Biochimica et Biophysica Acta 1609 (2003) 95 – 101 bestätigt. Weiter offenbaren J. Davidsen et al., dass die Eigenschaften solcher  
25 Wirkstoffträger in Form vorgeannter Liposomenträger insbesondere in Bezug auf ihr Freisetzungsverhalten von einer Vielzahl von chemischen und physikalischen Größen abhängen kann, deren Zusammenspiel noch nicht vollständig verstanden ist.

J. Davidsen et al. offenbaren in diesem Zusammenhang ihre Untersuchungen bezüglich einer Liposomenformulierung, bestehend aus einem 100-nm durchmessenden Liposomenträger. Der  
30 Liposomenträger kann aus 1,2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC) und/oder 1,2-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylen glykol)-2000] (DPPE-PEG2000) und/oder 1-O-hexadecanoyl-2-hexanodecnoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (1-O-DPPC) und/oder 1-O-hexadecanoyl-2-hexanodecnoyl-sn-glycero-3-phospho ethanolamin-N-[methoxy-

(polyethylen glykol)-350] (1-O-DPPE-PEG350) bestehen. Die vorgenannten Stoffe werden als Lipide bezeichnet, welche auch multilamellare Vesikel bilden können und welche zu der Stoffgruppe der Phospholipide gehören.

Es wird weiter offenbart, dass in der Liposomenformulierung umfassend 1-O-DPPC und 10 mol-% 1-O-DPPE-PEG350, Calcein eingeschlossen werden kann. Calcein wird hierbei als Modellsubstanz für Arzneimittel bezeichnet. Eine Freisetzung des Calcein kann gemäß der Offenbarung durch J. Davidsen et al. mittels Behandlung dieser Liposomenformulierung mit Phospholipase A2 (PLA2) erzielt werden. Die Freisetzung erfolgt durch hydrolytische Spaltung von entweder DPPC oder 1-O-DPPC, oder 1-O-DPPE-PEG350, welche durch PLA2 katalysiert wird, wobei ein Lysolipid und eine Fettsäure entstehen.

Damit offenbaren J. Davidsen et al. keine Spaltung in einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil. Insbesondere offenbaren J. Davidsen et al. nicht, dass der Liposomenträger eine Disulfidbindung umfassen kann.

Durch Meng et al. wird in „Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications“ erschienen in Biomaterials 30 (2009) 2180–2198 offenbart, dass bestimmte polymere Stoffe mit Disulfidbrücken entweder im polymeren Strang, oder in einer dessen Seitenketten geeignet sind, Wirkstoffe einzuschließen. Die dort offenbarten Stoffe weisen aber stets polymeren Charakter auf, da Partikel, d.h. Feststoffe, aus diesen gebildet werden, in denen die potentiellen Wirkstoffe eingeschlossen werden sollen.

Es handelt sich also in keinem Fall um Stoffe mit Lipidcharakter, die zur Herstellung von Liposomen geeignet wären.

Die offenbarte Wirkweise der Stoffe basiert auf der Möglichkeit der Bindungsspaltung der Disulfidgruppe, wodurch entweder die Polymere aufgelöst werden oder die Polyethylenglykolseitenketten, die mit der Disulfidgruppe an die Polymere gebunden sind, abgetrennt werden und damit das Partikel nach Anwendung im Patienten durch dessen Immunsystem erkennbar und abbaubar wird. Demnach basiert die Freisetzung aus dem Wirkstoffträger gemäß der Offenbarung nach Meng et al. entweder auf einem Auflösen eines Feststoffes durch Spaltung polymerer Bindungen oder durch Degradation des Feststoffes durch das Immunsystem des Patienten, nachdem das Partikel für diese erkennbar geworden ist. In keinem Fall wird der Wirkstoff direkt freigesetzt.

In der WO 2000/059474 A1 werden lipide Zusammensetzungen offenbart, die aus einer hydrophoben „Schwanzgruppe“ und einer hydrophilen „Kopfgruppe“ bestehen, wobei die letztgenannte hydrophile „Kopfgruppe“ an die hydrophobe „Schwanzgruppe“ kovalent angebunden ist. Innerhalb der hydrophilen „Kopfgruppe“ wird zwischen einer ersten und einer zweiten Region unterschieden, wobei

diese beiden Regionen durch eine Disulfidgruppe verbunden sind, die, etwa durch Glutathion, gespalten werden kann. Die erste Region der hydrophilen „Kopfgruppe“ trägt gemäß der WO 2000/059474 A1 bei physiologischem pH eine positive Ladung und die zweite Region trägt bei physiologischem pH eine negative Ladung. Die erste Region ist kovalent an die hydrophobe  
5 „Schwanzgruppe“ angebunden.

Die gemäß der WO 2000/059474 A1 allgemein offenbarte chemische Formel der vorgenannten lipiden Zusammensetzungen ist  $X - Y - S - S - Z$ . Hierbei bildet die chemische Gruppe X die vorgenannte hydrophobe „Schwanzgruppe“ und Y, sowie Z die erste bzw. zweite Region der hydrophilen Kopfgruppe.

10 Gemäß der weiteren Offenbarung der WO 2000/059474 A1 kann in der vorgenannten chemischen Formel die chemische Gruppe X als hydrophobe „Schwanzgruppe“ eine Gruppe, die im wesentlichen dem Glycerinrumpf eines Fettes ähnlich ist und an die die chemische Gruppe Y über eine weitere chemische Gruppe W angebunden ist.

Die chemische Gruppe W kann ausgewählt sein aus der Liste bestehend aus  $CHR_3$ ,  $NR_3$ ,  $N^+(R_3)_2$ , O, S,  $C(O)NH$ ,  $NH(CO)$ ,  $OC(O)NH$  und  $OP(O)(OR_3)O$ . Die in der chemischen Gruppe W weiter  
15 enthaltene chemische Gruppe  $R_3$  kann Wasserstoff oder ein  $C_1$ - $C_4$  Alkylrest sein.

Die chemische Gruppe Y kann ein  $C_1$ - $C_{12}$  Alkylrest, ein  $C_2$ - $C_{12}$  Alkenylrest oder ein  $C_2$ - $C_{12}$  Alkinylrest mit Substituenten in Form von Alkylresten, Aminoresten, Aminoalkylresten, Guanidinresten, Guanidinalkylresten, Amidorest oder Amidoalkylrest sein, wobei die vorgenannten  
20 Alkyl-, Alkenyl-, oder Alkinylreste der chemischen Gruppe Y weiter durch  $NR_3$ ,  $N^+(R_3)_2$ ,  $C(O)$ ,  $NHC(NH)$ ,  $C(NH)NH$ ,  $NHC(NH)NH$  unterbrochen sein können. Alternativ kann die chemische Gruppe Y auch ein Aminosäurerest oder ein Peptid sein.

Die chemische Gruppe Z kann gemäß der Offenbarung der WO 2000/059474 A1 ein  $C_1$ - $C_{12}$  Alkylrest, Alkenylrest oder ein Alkinylrest sein, der wiederum mit Alkylresten, Carboxylresten,  
25 Carboxyalkylresten, Aminosäureresten, Peptiden, Oligonucleotiden, oder sog. „Zielmolekülresten“ substituiert sein kann.

Die vorgenannten chemischen Gruppen X, Y und Z müssen aber in jedem Fall so ausgestaltet sein, dass die Gruppen X und Y in ihrer Gesamtheit bei physiologischem pH eine positive Ladung aufweisen und die Gruppe Z bei physiologischem pH eine negative Ladung aufweist.

30 Demzufolge entsteht bei der Spaltung von Stoffen der Formel  $X - Y - S - S - Z$  an der Disulfidgruppe gemäß der WO 2000/059474 A1 eine Gruppe der Art  $X - Y - S$ , die positiv geladen ist und eine chemische Gruppe der Art  $S - Z$ , die negativ geladen ist.

In jedem Fall ist die Gruppe der Art X – Y – S dadurch, dass sie immer noch die „hydrophobe Schwanzgruppe“ und eine positive Ladung umfasst, eine chemische Gruppe die, amphiphile Eigenschaften aufweist. D.h. die in einer Region hydrophob und in einer Region hydrophil ist. Die Gruppe der Art S – Z ist durch ihre negative Ladung und durch die Tatsache, dass diese einen C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> Alkylrest, Alkenylrest oder ein Alkynylrest umfasst entweder ebenfalls amphiphil oder sogar – im Fall besonders kurzer Alkylreste, Alkenylreste oder Alkynylreste – nur hydrophil.

Die WO 2000/059474 A1 offenbart weiter, dass die vorgenannten Stoffe zur Herstellung von Liposomenträgern geeignet sind, mittels derer eine gezielte Freisetzung von Stoffen an einem Wirkort erfolgen kann. Die Freisetzung basiert auf der chemischen Spaltung der Disulfidgruppe.

Die WO 2000/059474 A1 offenbart aber nicht, dass eine Spaltung eines vorher amphiphilen Stoffes in einen hydrophilen und einen hydrophoben Anteil erzielt werden kann.

Eine solche Aufteilung in einen hydrophilen und einen hydrophoben Anteil, würde aber eine besonders effiziente Destabilisierung und Auflösung des mit solchen Stoffen aufgebauten Liposomenträgers ermöglichen.

Neben den vorstehend beschriebenen Zusammensetzungen ist auch allgemein bekannt, dass spezielle Enzyme im Körper eines Säugetiers spezifische Bindungen von Stoffen angreifen und diese spalten. In diesem Zusammenhang offenbaren etwa D. Mustacich et al. in Biochem. J. (2000) 346, 1-8, „Thioredoxin reductase“, dass ein solches Enzym die Thioredoxin reductase (kurz (TrxRs) ist. Weiter wird offenbart, dass dieses Enzym insbesondere in Tumorgewebe mindestens zehnmal mehr vorhanden ist, als in gesundem Gewebe.

Darüber hinaus können spezifische Bindungen von Stoffen auch in biologischen Systemen dadurch gespalten werden, dass sich in unmittelbarer Nähe der Zellumgebung in der die Wirkung des Wirkstoffes erzielt werden soll, das Reduktionspotential signifikant und schlagartig ändert. Beispielsweise ist bekannt, dass Glutathion ein Reduktionsmittel ist, das insbesondere in der Nähe von Gewebe zu finden ist, in dem eine signifikante Anzahl von Zellen einer Stresssituation ausgesetzt sind, wie sie etwa durch Erkrankung des betreffenden Gewebes hervorgerufen wird.

Bei der Behandlung von Krebserkrankungen ist es vielfach erforderlich pharmazeutische Wirkstoffe einzusetzen, die neben ihrer primären Wirkung auf das Tumorgewebe auch signifikante Nebenwirkungen auf das gesunde Gewebe des Patienten haben.

Im Zuge von solchen Behandlungen wird der Patient vielfach mit einer größeren Dosis des pharmazeutischen Wirkstoffes behandelt, als dies die eigentliche Tumorerkrankung erfordern würde, da sichergestellt werden muss, dass die dem Patienten verabreichte Wirkstoffmenge den Wirkort (den

Tumor) noch in ausreichend großer Dosierung erreicht. Wünschenswert wäre es also, wenn der Wirkstoff nur am Wirkort freigesetzt würde und nur dort seine Wirkung entfalten würde. Dies würde zum einen eine Verringerung der Dosis und zum anderen eine geringere, negative Beeinträchtigung der Patienten zur Folge haben.

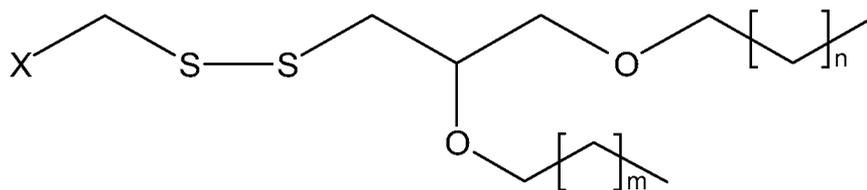
- 5 Es ist aber in vielen Fällen zugleich sicherzustellen, dass die Freisetzung des Wirkstoffs am potentiellen Wirkort sofort und möglichst quantitativ und nicht in schleichender Weise stattfindet.

Die vorgenannten Aufgaben werden unter Verwendung der im oben angegebenen Stand der Technik offenbarten Stoffe zum Aufbau eines Liposomenträgers aber bis heute nicht oder nur mangelhaft gelöst.

- 10 Es besteht daher die Aufgabe Stoffe zur Herstellung von Wirkstoffträgern in Form eines Liposoms bereitzustellen, die z.B. enzymatisch an einer Disulfidgruppe, enthalten in diesen Stoffen, gespalten werden können, so dass eine schnelle und möglichst vollständige Freisetzung der enthaltenen Wirkstoffe möglich ist. Es besteht die weitere Aufgabe, einen selbstorganisierten Wirkstoffträger in Form eines Liposoms unter Verwendung solcher Stoffe bereitzustellen, der etwa durch Enzyme  
15 destabilisiert werden kann und der bei der Spaltung den in ihm befindlichen Wirkstoff schnell und möglichst quantitativ frei gibt.

- Weiter besteht die Aufgabe ein Verfahren zur Wirkstofffreisetzung unter Verwendung des vorgenannten Wirkstoffträgers bereitzustellen, der es ermöglicht eine Medizin herzustellen, welche für die zielgerichtete Behandlung etwa von Tumorerkrankungen geeignet ist, indem der Wirkstoff nur in  
20 unmittelbarer Nähe zum Wirkort des menschlichen Körpers schnell und möglichst quantitativ aus der Medizin freigesetzt wird.

Als erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung wurden daher nun Stoffe geeignet zur Herstellung von Wirkstoffträgern in Form eines Liposoms gemäß der Formel (I)



(I)

- 25 **dadurch gekennzeichnet**, dass die Stoffe gemäß Formel (I)

- (a) in X auf der einen Seite der Disulfidgruppe eine hydrophile chemische Gruppe umfassend mindestens fünf Kohlenstoffatome und umfassend mindestens eine Ethergruppe und/oder Amingruppe oder Ammoniumgruppe aufweisen, und wobei

- (b) auf der anderen Seite der Disulfidgruppe eine hydrophobe Gruppe befindlich ist, in der n und m unabhängig von einander eine natürliche Zahl von 1 bis 30 sind, wobei aber die Summe aus n und m mindestens 16 beträgt,

gefunden.

- 5 Die erfindungsgemäßen Stoffe gemäß der Formel (I) sind insbesondere vorteilhaft, weil diese in den Resten mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen chemische Gruppen aufweisen, die hydrophobe Eigenschaften besitzen und zugleich sterisch dazu führen, dass bei Einbringen der Stoffe gemäß der Formel (I) in ein polares Medium diese Stoffe sich selber so anordnen, dass es zur Ausbildung von sphärischen Strukturen kommt.
- 10 Dabei entstehen üblicherweise sogenannte Lipiddoppelschichten, wobei die hydrophilen chemischen Gruppen X der Stoffe gemäß der Formel (I) sich sowohl außen als auch innen hin zum polaren Lösemittel, das sich auch im Inneren der vorgenannten sphärischen Strukturen befinden kann, orientieren, während die hydrophoben chemischen Gruppen beider Schichten ins Innere der Lipiddoppelschicht orientiert sind.
- 15 Diese sphärische Anordnung kann an der ebenfalls in den Stoffen gemäß der Formel (I) vorgesehenen Disulfidgruppe selektiv aufgelöst werden, indem diese selektiv gespalten wird, so dass hiernach eine hydrophile chemische Gruppe bestehend aus den chemischen Gruppen X und einem Schwefelrest, sowie eine hydrophobe chemische Gruppe umfassend die Reste mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen entsteht. Damit wird mit den neuartigen Stoffen erstmals die Trennung eines zuvor amphiphilen
- 20 Stoffes, geeignet zum Aufbau eines Wirkstoffträgers in Form eines Liposoms, in einen hydrophilen und einen hydrophoben Anteil über die Spaltung einer Disulfidbindung möglich.

Die Reste mit n, m Kohlenstoffatomen gemäß der Formel (I) sind üblicherweise gesättigte Kohlenwasserstoffreste, wie dies auch in der Formel (I) dargestellt ist.

- Die Reste mit n, m Kohlenstoffatomen können auch einfach oder mehrfach ungesättigte Reste sein. Es
- 25 können die Reste mit n, m Kohlenstoffatomen somit auch eine oder mehrere Doppel- und/oder Dreifachbindungen aufweisen.

Die Formel (I) ist demnach gemäß der vorliegenden Erfindung hinsichtlich der darin dargestellten Kohlenwasserstoffreste mit n, m Kohlenstoffatomen nicht so zu verstehen, als dass diese Reste ausschließlich gesättigte Kohlenwasserstoffreste mit n, m Kohlenstoffatomen sind.

- 30 Die chemische Gruppe X umfasst in bevorzugten Ausführungsformen mindestens acht Kohlenstoffatome.

Es ist ebenfalls bevorzugt, wenn die chemische Gruppe X neben der mindestens einen Ethergruppe und/oder Amingruppe oder Ammoniumgruppe auch mindestens eine Carbonsäureestergruppe umfasst.

Es ist besonders bevorzugt, wenn die chemische Gruppe X entweder mindestens zwei Ethergruppen oder mindestens eine Amingruppe oder Ammoniumgruppe und mindestens zwei  
5 Carbonsäureestergruppen umfasst.

Es ist ebenfalls besonders bevorzugt, wenn die mindestens eine Amingruppe oder Ammoniumgruppe der chemischen Gruppe X der Stoffe gemäß der Formel (I) eine quarternäre Ammoniumgruppe ist. In solchen Ausführungsformen trägt der Stoff gemäß der Formel (I) mindestens eine positive Ladung und liegt in Kombination mit mindestens einem einfach oder mehrfach negativ geladenen Gegenion vor.  
10 Solche Gegenionen können etwa Halogenionen, wie Chlorid, Bromid und/oder Iodid, aber auch beliebige andere Gegenionen mit negativen Ladungen sein.

Es ist ganz besonders bevorzugt, wenn die chemische Gruppe X der Stoffe gemäß der Formel (I) mindestens drei Ethergruppen umfasst. Hierbei ist es bevorzugt, wenn die chemische Gruppe X über eine Carbonsäureestergruppe an eine chemische Gruppe Y gemäß der nachstehend beschriebenen  
15 weiteren bevorzugten Ausführungsform angebunden ist.

Innerhalb dieser ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der Stoffe gemäß der Formel (I) ist die chemische Gruppe X, die dann weiter bevorzugt nur eine Amingruppe oder Ammoniumgruppe enthält, ebenfalls bevorzugt über diese Amingruppe oder Ammoniumgruppe an den Rest des Stoffes gemäß der Formel (I) angebunden.

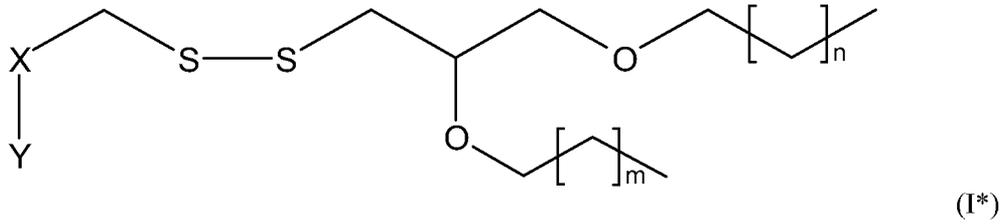
20 Diese Ausführungsform ist insbesondere vorteilhaft, weil die Amingruppe oder Ammoniumgruppe und die mindestens drei Ethergruppen in ihrer Gesamtheit eine besonders hydrophile Eigenschaft der chemischen Gruppe X zur Folge haben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Stoffe gemäß der Formel (I) umfasst die chemische Gruppe X auch eine Phosphatgruppe.

25 In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Stoffe gemäß der Formel (I) ist an die chemische Gruppe X eine chemische Gruppe Y angebunden, wobei die chemische Gruppe Y eine chemische Gruppe, ausgewählt aus der Liste, bestehend aus Biotin, Protein, Peptid, Nucleinsäure Nucleosid und Glykogruppe ist. Nicht abschließende Beispiele für Glykogruppen gemäß der vorliegenden Erfindung sind etwa Mannosegruppen oder Glukosegruppen.

30

Die Stoffe dieser weiteren bevorzugten Ausführungsform sind Stoffe gemäß der Formel (I\*).



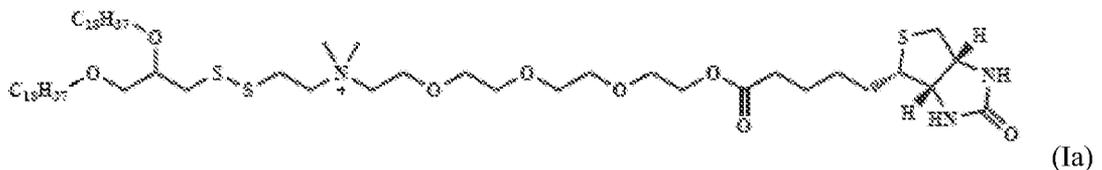
Die chemische Gruppe Y ist in bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung Biotin.

In der bevorzugten Ausführungsform, in der die chemische Gruppe Y Biotin ist, kann diese entweder durch eine Amidbindung oder über eine Carbonsäureestergruppe an die chemische Gruppe X angebunden sein.

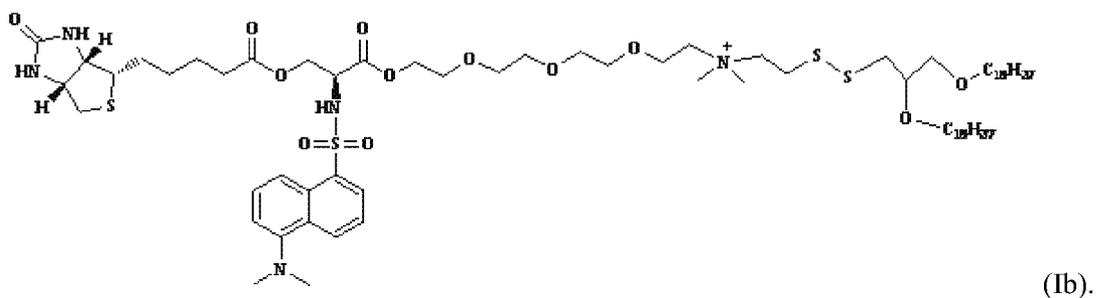
In dieser weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die chemische Gruppe Y an die chemische Gruppe X terminal oder als Seitengruppe angebunden vorliegen. In allen Ausführungsformen der Stoffe gemäß der Formel (I\*) dient die chemische Gruppe Y der (bio-) chemischen Identifikation der Stoffe gemäß Formel (I).

10 Indem die Gruppe Y etwa im Falle der Verwendung von Biotin gemäß der bevorzugten Ausführungsform (bio-) chemisch eindeutig durch Streptavidin erkannt wird, lässt sich hieran eine weitere chemische und/oder biologische Gruppe anbinden, die dem Stoff gemäß der Formel (I\*) weitere (bio-) chemische Eigenschaften verleiht. So kann etwa ein mit Streptavidin konjugierter Antikörper an das Biotin gebunden werden, der den Stoff gemäß der Formel (I\*) sodann befähigt über  
15 die Wirkung des Antikörpers bevorzugt an Zielmolekülen zu akkumulieren.

Insbesondere bevorzugte Stoffe gemäß der Formel (I\*) sind jene gemäß der Formel (Ia)

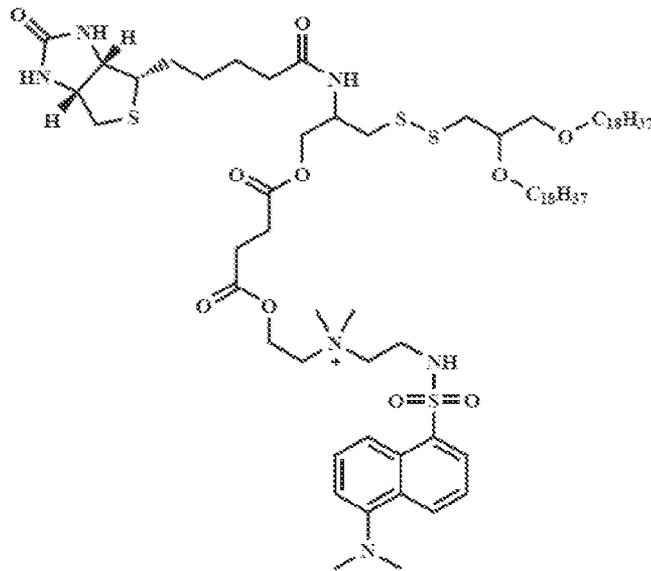


oder gemäß der Formel (Ib)



In einer weiteren ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der Stoffe gemäß der Formel (I\*) umfasst die chemische Gruppe X zwei Carbonsäureestergruppen, eine erste Amingruppe oder Ammoniumgruppe und eine zweite Amingruppe oder Ammoniumgruppe, so dass die chemische Gruppe Y an die chemische Gruppe X über eine Amidbindung angebunden ist.

- 5 Innerhalb jener weiteren ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der Stoffe gemäß Formel (I\*) ist der Stoff gemäß der Formel (Ic)



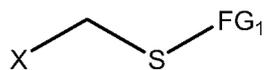
(Ic)

insbesondere bevorzugt.

- 10 In einer bevorzugten Weiterentwicklung der erfindungsgemäßen Stoffe umfasst die chemische Gruppe X eine weitere chemische Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' als deren Bestandteil, die an die chemische Gruppe X kovalent gebunden ist.

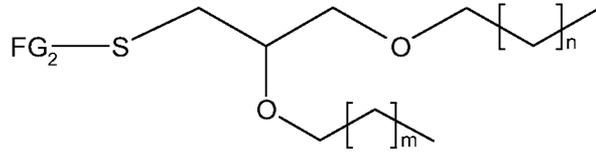
Innerhalb dieser bevorzugten Weiterentwicklung umfasst die chemische Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' eine Dansylgruppe. Diese ist etwa in den insbesondere bevorzugten Stoffen gemäß den Formeln (Ib) und (Ic) bereits vorhanden.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Stoffe gemäß der Formel (I), das **dadurch gekennzeichnet** ist, dass ein Stoff gemäß der Formel



(IIa),

mit einem Stoff der Formel



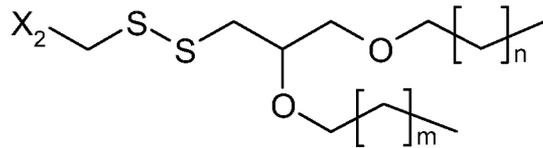
(IIIa),

oder ein Stoff der Formel



(IIb),

mit einem Stoff der Formel



5

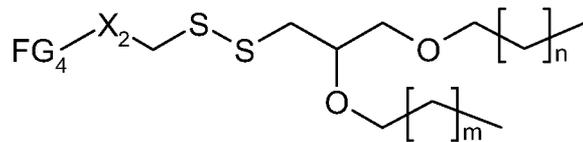
(IIIb),

oder ein Stoff der Formel



(IIc),

mit einem Stoff der Formel



(IIIc),

10 oder ein Stoff der Formel (IIb) mit einem Stoff der Formel (IIIc)

in einem Lösungsmittel (LM) zur Reaktion gebracht wird.

Die in den vorstehenden Formeln (IIa), (IIIa), (IIb) und (IIIc) angegebenen chemischen Gruppen FG<sub>1</sub>, FG<sub>2</sub>, FG<sub>3</sub>, FG<sub>4</sub> sind Gruppen ausgewählt aus der Liste bestehend aus Wasserstoff, Halogen, Phtalimido-, Succinimido-, einer Sulfonyloxygruppe, wie beispielsweise Benzolsulfonyloxy, Tosylat, und Triflat-.

15

Bevorzugt sind die chemischen Gruppen FG<sub>1</sub>, FG<sub>2</sub> und FG<sub>4</sub> Wasserstoff und die chemische Gruppe FG<sub>3</sub> ist Tosyl-.

Die in den vorstehenden Formeln (IIb), (IIIb), (IIc) und (IIIc) angegebenen chemischen Gruppen  $X_1$  und  $X_2$  sind jeweils Bestandteile der chemischen Gruppe X gemäß der Formeln (I), (Ia), (Ib) und/oder (Ic). Die kovalente Bindung zwischen  $X_1$  und  $X_2$  unter Abspaltung von  $FG_3$  im Fall der chemischen Reaktion zwischen den Stoffen gemäß der Formel (IIb) und (IIIb) führt somit zur Bildung der chemischen Gruppe X als Bestandteil der Stoffe gemäß der Formeln (I), (I\*), (Ia), (Ib) und/oder (Ic). Analoges gilt im Zusammenhang mit den Reaktionen der Stoffe (IIc) und (IIIc), sowie (IIb) und (IIIc) auch für die chemische Gruppe  $FG_4$ .

In bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens befindet sich in der chemischen Gruppe  $X_1$  oder  $X_2$  eine Aminogruppe, über die die Bindung zwischen den chemischen Gruppen  $X_1$  und  $X_2$  unter Erhalt der chemischen Gruppe  $XCH_2$  kovalent erfolgt.

Bei der Reaktion der Stoffe (IIb) und (IIIb), sowie (IIc) und (IIIc) oder (IIb) und (IIIc) wird üblicherweise ein Stoff gemäß Formel (I) erhalten, der innerhalb der chemischen Gruppe X eine positive Ladung trägt und zusammen mit der chemischen Gruppe  $FG_3$  und/oder  $FG_4$ , die dann durch Abspaltung eine negative Ladung trägt, ein Salz bildet.

In einer ersten Weiterentwicklung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Stoffe gemäß der Formel (IIIb) und (IIIc) aus Stoffen gemäß der Formel (IIIa) erhalten, indem eine Azodicarbonylverbindung, bevorzugt 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion, zu dem Stoff gemäß der Formel (IIIa) in einem Lösungsmittel (LM) gegeben wird und hiernach zu der resultierenden Reaktionslösung ein Thioalkohol, bevorzugt ein Stoff ausgewählt aus der Liste bestehend aus Cysteinol, 2-Aminoethanthiol und 2-Dimethylaminoethanthiol und Cystein, bevorzugt 2-Dimethylaminoethanthiol hinzugegeben wird.

In der Weiterentwicklung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es bevorzugt, die Zugabe einer Azodicarbonylverbindung bei Temperaturen von  $10^\circ\text{C}$  bis  $40^\circ\text{C}$ , bevorzugt bei Raumtemperatur ( $23^\circ\text{C}$ ) auszuführen und hiernach die entstandene Reaktionslösung für eine Zeit von etwa zwei Stunden auf  $40^\circ\text{C}$  bis  $60^\circ\text{C}$  zu erwärmen. Die Zugabe von einem Thioalkohol geschieht üblicherweise nachfolgend wiederum bei Temperaturen von  $10^\circ\text{C}$  bis  $40^\circ\text{C}$ , bevorzugt bei Raumtemperatur ( $23^\circ\text{C}$ ).

Es ist innerhalb der bevorzugten Weiterentwicklung des erfindungsgemäßen Verfahrens ebenfalls bevorzugt, wenn nach der vorstehenden Reaktion unter Zugabe einer Azodicarbonylverbindung und nachfolgender Zugabe von einem Thioalkohol ein Reinigungsschritt zum Abtrennen gegebenenfalls gebildeter Nebenprodukte vorgesehen wird.

Solche Reinigungsschritte können etwa die dem Fachmann allgemein bekannten präparativen chromatographischen Verfahren, wie etwa Dünnschicht, oder Säulenchromatographieverfahren sein.

Das Lösungsmittel (LM) in dem die vorgenannten Reaktionen ausgeführt werden ist beispielsweise ausgewählt aus der Liste bestehend aus Acetonitril (MeCN), halogenierte Kohlenwasserstoffe, unhalogenierte Kohlenwasserstoffe und Alkohole ohne darauf beschränkt zu sein.

Bevorzugte halogenierte Kohlenwasserstoffe sind Dichlormethan (DCM) und Trichlormethan (TCM).

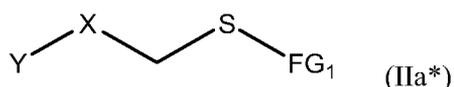
- 5 Die Reaktion der Stoffe (IIa) und (IIIa) bzw. (IIb) und (IIIb) findet üblicherweise bei Temperaturen von Raumtemperatur (23°C) bis 80°C statt. Bevorzugt bei Temperaturen von 40°C bis 80°C.

In einer weiteren Weiterentwicklung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird an die chemische Gruppe X eine weitere chemische Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' als deren Bestandteil, gemäß vorstehender Definition kovalent angebunden.

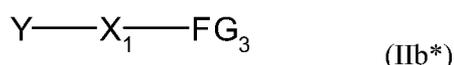
- 10 Üblicherweise geschieht dieses Anbinden der chemischen Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' vor der Reaktion der Stoffe gemäß Formel (IIa) und (IIIa), bzw. (IIb) und (IIIb). Es kann, insbesondere wenn das Anbinden der chemischen Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' nach der Reaktion der Stoffe gemäß Formel (IIa) und (IIIa), bzw. (IIb) und (IIIb) ausgeführt wird, notwendig sein, dass chemisch funktionelle Gruppen enthalten in der chemischen Gruppe X, wie beispielsweise Amino- oder
- 15 Carboxylgruppen zuvor mit Schutzgruppen vor der Reaktion mit der chemischen Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' geschützt werden müssen. Eine solche Schutzgruppe ist beispielsweise ein Tert-butyl-diphenyl-silyl-Rest.

- Die chemische Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' als Bestandteil der chemischen Gruppe X kann im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens auch mehr chemische Gruppen enthalten, als jene die für
- 20 die eigentliche Fluoreszenzeigenschaft verantwortlich sind. Insbesondere können Anteile der später in der chemischen Gruppe X des Stoffes gemäß der Formel (I) enthaltenen Gruppen erst durch das Anbinden der chemischen Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' in diese chemische Gruppe X der Stoffe gemäß der Formel (I) eingebracht werden.

- Das vorstehende, erfindungsgemäße Verfahren kann in einer bevorzugten Ausführungsform durch
- 25 Einsatz von Stoffen gemäß der Formel (IIa\*)



oder gemäß der Formel (IIb\*)

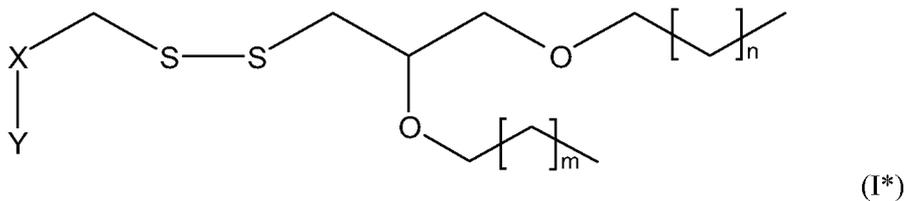


oder gemäß der (IIc\*)



Zugleich sind die Stoffe gemäß der Formel (I) in einem solchen Liposom, aber an der vorgesehenen Disulfidgruppe selektiv spaltbar, so dass hiernach eine hydrophile chemische Gruppe bestehend aus der chemischen Gruppe X und einem Schwefelrest, sowie eine hydrophobe chemische Gruppe umfassend die Reste mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen entstehen.

- 5 In bevorzugten Ausführungsformen der selbstorganisierten Wirkstoffträger in Form eines Liposoms kann dieser Wirkstoffträger auch mindestens einen Stoff gemäß der Formel (I\*)



umfassen, wobei die chemische Gruppe Y eine chemische Gruppe ausgewählt aus der Liste bestehend aus Biotin, Protein, Peptid, Glykgruppe, Nucleinsäure, Nucleosid oder Glykgruppe ist.

- 10 Der vorgenannte, erfindungsgemäße Wirkstoffträger umfasst üblicherweise neben den Stoffen gemäß der Formel (I) und/oder (I\*) mindestens noch einen weiteren Stoff, mit mindestens einer chemischen Gruppe mit lipophilen Eigenschaften und mindestens einer chemischen Gruppe mit hydrophilen Eigenschaften. Solche weiteren Stoffe sind bevorzugt Lipide.

15 Solche Lipide sind üblicherweise jene aus der Stoffklasse der Phospholipide, insbesondere Phosphatidylcholin und/oder Phosphatidylethanolamin.

Bevorzugte Lipide sind solche ausgewählt aus der Liste bestehend aus L- $\alpha$ -phosphatidylcholin, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, Ammonium-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-lissamin rhodamin B sulfonyl).

- 20 Die vorgenannten weiteren Stoffe ordnen sich bei Einbringen in ein polares Medium in gleicher Weise wie die Stoffe gemäß der Formel (I) an.

Der erfindungsgemäße Wirkstoffträger, der oben genannte weitere Stoffe umfasst, enthält diese üblicherweise zu einem molaren Anteil von mindestens 50 %, bevorzugt von mindestens 70 %, besonders bevorzugt von 80 bis 90 %.

- 25 In bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Wirkstoffträgers umfasst dieser zwei Lipide als weitere Stoffe.

Innerhalb dieser bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Wirkstoffträgers ist eines der zwei Lipide bevorzugt L- $\alpha$ -phosphatidylcholin. Besonders bevorzugt ist das L- $\alpha$ -phosphatidylcholin jenes L- $\alpha$ -phosphatidylcholin, welches aus Eiern von Hühnern gewonnen werden kann.

5 In einer ersten besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Wirkstoffträger besteht dieser aus einem molaren Anteil von L- $\alpha$ -phosphatidylcholin zwischen 70 und 90 %, einem molaren Anteil von Ammonium-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-lissamin rhodamin B sulfonyl) zwischen 0,01 und 2 % und einem Anteil eines Stoffes gemäß Formel (I), so dass insgesamt 100 % molarer Anteil erhalten werden.

10 In einer zweiten besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Wirkstoffträger besteht dieser aus einem molaren Anteil von L- $\alpha$ -phosphatidylcholin zwischen 10 und 30 %, einem molaren Anteil von 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin zwischen 50 und 65 % und einem Anteil eines Stoffes gemäß der Formeln (I), (I\*), so dass insgesamt 100 % molarer Anteil erhalten werden.

15 Die erfindungsgemäßen Wirkstoffträger sind Liposomen, die sogenannte Lipiddoppelschichten umfassen, wobei sich die gerade beschriebenen hydrophilen chemischen Gruppen X der Stoffe gemäß der Formeln (I), (I\*), die Bestandteil dieser Wirkstoffträger sind, hin zum polaren Lösemittel orientieren, während die hydrophoben chemischen Gruppen der Stoffe gemäß der Formeln (I), (I\*) bzw. der vorstehend beschriebenen Lipide beider Schichten ins Innere der Lipiddoppelschicht orientiert sind.

20 Ein letzter Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Freisetzung eines Wirkstoffs aus den erfindungsgemäßen Wirkstoffträgern in Form eines Liposoms, **dadurch gekennzeichnet**, dass amphiphile Stoffe gemäß der Formel (I) oder (I\*) an ihrer Disulfidgruppe chemisch in einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil gespalten werden.

25 Die chemische Spaltung gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren kann eine enzymatisch katalysierte chemische Spaltung sein oder kann eine nicht enzymatisch katalysierte Reduktion sein, bei der die Disulfidgruppe der Stoffe gemäß der Formel (I) und/oder (I\*) in Folge ihrer Reduktion gespalten wird.

30 Bevorzugt ist die chemische Spaltung, eine enzymatisch katalysierte Spaltung. Das Enzym, das eine solche chemische Spaltung katalysiert, ist bevorzugt eine Thioreductase, Thiooxidase, Thiooxireductase oder Thidisulfidoxidoreductase.

Ebenfalls bevorzugt ist die nicht enzymatisch katalysierte Spaltung der Disulfidgruppe durch Reduktion, wobei als Reduktionsmittel ein Stoff ausgewählt aus der Liste bestehend aus Gluthathion,

Cystein, Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) Dithiothreitol (DTT) und 1,4-Dithioerythritol (DTE) eingesetzt wird. Bevorzugt ist dieses Reduktionsmittel Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP).

Die vorgenannten Reduktionsmittel sind besonders vorteilhaft, weil diese üblicherweise ein Reduktionspotential aufweisen, das lediglich ausreicht mindestens eines der beiden Schwefelatome  
5 der Disulfidgruppe der Stoffe gemäß der Formel (I) und/oder (I\*) zu reduzieren, wodurch deren Bindung gespalten wird. Gleichzeitig reicht das Reduktionspotential der vorgenannten Reduktionsmittel aber nicht aus andere chemische Gruppen der Stoffe gemäß der Formel (I) und/oder (I\*) oder Gruppen der weiteren Stoffe der erfindungsgemäßen Wirkstoffträger in Form eines Liposoms zu reduzieren.

10 Damit wird insbesondere sichergestellt, dass eine Spaltung der amphiphilen Stoffe gemäß der Formel (I) oder (I\*) in einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil stattfindet, wodurch die erfindungsgemäße Freisetzung besonders vorteilhaft erfolgt.

Gluthathion und Cystein sind Stoffe, die auch im Körper von Säugern, insbesondere Menschen an entzündlich veränderten Stellen in besonders hoher Konzentration auftreten, wodurch insbesondere  
15 hier mit der vorliegenden Erfindung eine gezielte Freisetzung ermöglicht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Freisetzung eines Wirkstoffes basiert auf der überraschenden Erkenntnis, dass es ausreicht, die in den Wirkstoffträgern enthaltenen Stoffe gemäß der Formeln (I) und/oder (I\*) in einen hydrophilen Anteil und einen hydrophoben Anteil zu spalten, was, ohne an eine Theorie gebunden zu sein, dazu führt, dass das Liposom dergestalt destabilisiert wird, dass es  
20 aufbricht und den in ihm enthaltenen Wirkstoff freisetzt.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und Abbildungen erläutert, ohne sie jedoch hierauf zu beschränken.

Fig. 1 zeigt Versuchsergebnisse gemäß Beispiel 10. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität (F) über der vermessenen Wellenlänge  $\lambda$  in nm der Zusammensetzung VII gemäß dem Beispiel 9 zum  
25 Zeitpunkt  $t = 0$  (A), d.h. direkt nach deren Herstellung, zum Zeitpunkt  $t = 2$  h (B), sowie unmittelbar nach Zugabe von Triton X 100 (C).

Fig. 2 zeigt einen Teil der Versuchsergebnisse gemäß Beispiel 11. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (F\*) bei einer Wellenlänge von 520 nm über die Zeit (t) ab Zugabe von TCEP zur Lösung der Zusammensetzung III gemäß Beispiel 9 bei Temperaturen von 30°C (IIIa), 35°C (IIIb)  
30 und 40°C (IIIc).

Fig. 3 zeigt einen Teil der Versuchsergebnisse gemäß Beispiel 11. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität (F\*) bei einer Wellenlänge von 520 nm über die Zeit (t) ab Zugabe von TCEP

zur Lösung der Zusammensetzung IV gemäß Beispiel 9 bei Temperaturen von 30°C (IVa), 35°C (IVb) und 40°C (IVc).

Die vorliegende Erfindung wird weiterhin anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert, ohne sie hierauf zu beschränken.

## Beispiele

### **Beispiel 1: Herstellen eines Stoffes gemäß der Formel (IIIa)**

3,2g (29 mmol) 3-Mercaptopropan-1,2-diol wurden unter Eiskühlung (0°C) in 35 ml Ethanol und 28 ml einer 2 molaren NaOH Lösung gelöst. Unter Rühren wurden 5,1 ml (44 mmol) Benzylchlorid  
5 langsam (innerhalb 1 h) zugegeben. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert (Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH; 5:1; R<sub>f</sub> =0.4) und nach einer Stunde Rühren bei 0°C wurde das Reaktionsgemisch mit 2 molarer Salzsäure neutralisiert.

Mit Toluol wurde das Lösungsmittel anschließend azeotrop abdestilliert und der Rückstand in CHCl<sub>3</sub> aufgenommen und filtriert. Das Chloroform wurde daraufhin abdestilliert und das erhaltene Öl mittels  
10 Säulenchromatographischer-Filtration (Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH; 5:1) gereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden vom Lösungsmittel befreit und 5,47g (28mmol) 3-(Benzylthio)propan-1,2-diol wurden als farbloses Öl erhalten. Dies entsprach einer Ausbeute von 95 %.

Von dem somit erhaltenen 3-(Benzylthio)propan-1,2-diol wurden 3 g (15,1 mmol) zusammen mit 11,1g (33,2 mmol) 1-Octadecylbromid in 40 ml Toluol gelöst und es wurden unter Rühren bei  
15 Raumtemperatur (23°C) 2,2 g (39,8 mmol) Kaliumhydroxid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend bei 115°C für 27 h unter Rückfluss zur Reaktion gebracht. Von dem erkalteten Gemisch wurde das Toluol durch Destillation entfernt und der feste Rückstand in Diethylether aufgenommen. Die Suspension wurde einmal mit einer gesättigten Ammoniumchloridlösung und zweimal mit Wasser extrahiert und die abgetrennte organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend  
20 wurde das Gemisch filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden hieraus 10,6 g (15,1 mmol) an 3-(Benzylthio)-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan als farbloses Öl erhalten, was einer quantitativen Ausbeute entsprach.

10,6 g des erhaltenen 3-(Benzylthio)-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan wurden bei 40°C in 160 ml trockenem Isopropanol gelöst. Hiernach wurden 6 g (261 mmol) metallischen Natriums in kleinen  
25 Stücken zu der gerührten Lösung gegeben. Nach Beendigung der Zugabe wurde das Gemisch bei 91°C für 24 h unter Rückfluss zur Reaktion gebracht. Anschließend ließ man das Reaktionsgemisch auf 50°C erkalten und überführte die Suspension in 200 g Eis. Unter jener Eiskühlung wurde die Suspension mit 2 molarer Salzsäurelösung angesäuert, so dass ein pH-Wert von 2 erhalten wurde und 400 ml Chloroform zugegeben. Die organische Phase wurde daraufhin abgetrennt und mit 500 ml  
30 gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die Chloroform-Phase wurde erneut abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Feststoffanteil wurde abfiltriert und das gesammelte Filtrat wurde im Trockenschrank vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Gradient: Cyclohexan → DCM/Cyclohexan, 1:1; R<sub>f</sub> =0.4) gereinigt und die vereinigten Fraktionen am Rotationsverdampfer eingengt und getrocknet.

Es wurden hiermit 3,31 g (5,4mmol) 3-Mercapto-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan als farbloser Feststoff erhalten, was einer Ausbeute von 36 % entsprach. Dieses 3-Mercapto-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan entspricht dem Stoff gemäß der Formel (IIIa), wobei n und m jeweils 18 beträgt und die chemische Gruppe  $FG_2$  Wasserstoff ist.

#### 5 **Beispiel 2: Herstellen eines Stoffes gemäß der Formel (IIIb)**

400 mg (0,66 mmol) 3-Mercapto-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan, die aus Beispiel 1 erhalten wurden, wurden in 14 ml trockenem Dichlormethan (DCM) und 5,7 ml trockenem Acetonitril gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur (23°C) wurden 114 mg (0,66 mmol) 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) zugegeben. Die damit erhaltene rote Lösung wurde unter Schutzgas (Argon) für eine halbe  
10 Stunde bei Raumtemperatur (23°C) gerührt und dann mit einem Ölbad auf 50-55°C erwärmt.

Nachdem sich das Gemisch nach etwa 2 Stunden Reaktionszeit entfärbt hatte, wurden 243 mg (1,72 mmol) 2-Dimethylaminoethanthiol HCl zugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur (23°C) für etwa 20 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde daraufhin durch Destillation entfernt und der erhaltene Rückstand durch Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel:  
15 DCM/Methanol, 12:1;  $R_f = 0.6$ ) gereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden vom Lösungsmittel befreit und es wurden hieraus 322 mg (0,45 mmol) 2-((2,3-Bis(octadecyl)propyl)disulfanyl)-N,N-dimethylethanamin als farbloser Feststoff erhalten. Dies entsprach einer Ausbeute von 68 %. Das erhaltene 2-((2,3-Bis(octadecyl)propyl)disulfanyl)-N,N-dimethylethanamin entspricht dem Stoff gemäß der Formel (IIIb), wobei n und m jeweils 18 beträgt und die chemische Gruppe  $X_1$  N,N-dimethylaminoethyl ist.  
20

#### **Beispiel 3: Herstellen eines Stoffes gemäß der Formel (IIb\*)**

2,74g (68,5 mmol) Natriumhydroxid wurden in 15 ml Wasser gelöst. Unter Rühren ließ man 87,8 g (452 mmol) Tetraethylenglykol, die zuvor in 15 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst wurden, in die hergestellte Natronlauge zutropfen. Das Reaktionsgemisch wurde gekühlt (0°C) und 8,3 g  
25 (43,7 mmol) Tosylchlorid, die zuvor in 50 ml THF gelöst wurden, wurden langsam über einen Zeitraum von 1,5 Stunden zugegeben. Man ließ daraufhin das Gemisch unter Eiskühlung für weitere 2 h unter Rühren reagieren. Anschließend wurde die viskose Masse auf 250 g Eis gegossen und die Emulsion mit 300 ml Dichlormethan (DCM) extrahiert. Die organische Phase wurde drei mal mit je 50 ml Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde  
30 anschließend abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach dem Trocknen im Vakuum (3 mbar, 40°C) wurden 14,06 g (40 mmol) 1-O-Tosyl-tetraethylenglykol als farbloses Öl erhalten. Dies entsprach einer Ausbeute von 92 %.

In 30 ml Dichlormethan (DCM) wurden 1 g (4,1 mmol) (+)-Biotin, 1,04 g (4,1 mmol) 1-O-Tosyl-tetraethylenglykol, 1,01g (4,9 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 70 mg (0,57 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) suspendiert und bei Raumtemperatur (23°) für 96 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel  
5 befreit und durch Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel: DCM/Methanol, 10:1;  $R_f=0.3$ ) gereinigt. Das Lösungsmittel der erhaltenen Fraktionen wurde daraufhin durch Destillation entfernt und 1,03 g (1,7 mmol) 1-O-Tosyl-2-O'-Biotinyl-tetraethylenglykol als farblosen Feststoff erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 43 %. Das erhaltene 1-O-Tosyl-2-O-biotinyl-tetraethylenglykol entspricht dem Stoff gemäß der Formel (Iib\*), wobei 1-O-Tosyl- der chemischen  
10 Gruppe FG<sub>3</sub> entspricht, 2-O-Biotinyl- der chemischen Gruppe Y entspricht und das Tetraethylenglykol die chemische Gruppe X ist.

**Beispiel 4: Herstellen eines Stoffes gemäß der Formel (I), insbesondere gemäß der Formel (Ia)**

In 1,7 ml Chloroform wurden 161 mg (0,23 mmol) 2-((2,3-Bis(octadecyl)propyl)disulfanyl)-N,N-dimethylethanamin aus Beispiel 2 und 332 mg (0,58 mmol) 1-O-Tosyl-2-O'-biotinyl-tetraethylenglykol aus Beispiel 3 suspendiert und unter Argon in einem Druckgefäß verschlossen. Das  
15 Reaktionsgemisch wurde auf 70°C erwärmt und für sieben Tage gerührt. Anschließend ließ man die Mischung auf Raumtemperatur (23°C) abkühlen und das Lösungsmittel wurde durch Destillation entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel: DCM/Methanol, 5:1;  $R_f=0.2$ ) gereinigt und 115 mg (0,09 mmol) 2-((2,3-Bis(octadecyloxy)propyl)disulfanyl)-N,N-dimethyl-N-(2-O-biotinyl-tetraethylenglykol-1-yl)-  
20 ethanammonium-tosylat als Tosylat-Salz des Stoffes gemäß der Formel (Ia) in Form eines gelben Feststoffs erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 39 %.

**Beispiel 5: Herstellen eines Stoffes gemäß Formel (Iib\*) umfassend eine chemische Gruppe X'**

311 mg (2 mmol) Serinmethylester HCl wurden in 6 ml, einer gesättigten  
25 Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst und in eine Mischung aus 540 mg (2 mmol) Dansylchlorid und 24 ml Aceton/Wasser (2:1) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 Stunden bei Raumtemperatur (23°C) gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in 100 ml Wasser und 140 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach erfolgter Filtration wurde das Filtrat am  
30 Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand im Vakuum getrocknet (4 mbar, 40°C). Die anschließende Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: DCM/Methanol, 10:1;  $R_f=0.7$ ) zeigte eine reine Produktfraktion. Man erhielt somit 568 mg (1,6 mmol) 2-N-Dansyl-serinmethylester als gelben Feststoff.

568 mg (1,6 mmol) des 2-N-Dansyl-serinmethylesters wurden in 12 ml trockenem Dichlormethan (DCM) gelöst und unter Rühren wurden 394 mg (1,6 mmol) (+)-Biotin, 399 mg (1,9 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 28 mg (0,23 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) zugegeben. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur (23°C) für neun Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend durch Destillation entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; DCM/Methanol, 20:1;  $R_f=0.5$ ) gereinigt. Es wurden hierdurch 725 mg (1,3 mmol) 3-O-Biotinyl-2-N-dansyl-serinmethylester als gelber Feststoff erhalten.

Der erhaltene 3-O-Biotinyl-2-N-dansyl-serinmethylester wurde in seiner Gesamtheit in 10 ml Dichlorethan (DCE) suspendiert und 1 g (5,5 mmol)  $\text{Me}_3\text{SnOH}$  unter Rühren zugegeben. Die Suspension wurde unter Schutzgas (Argon) bei 70°C für 1,5 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit 150 ml Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wurde 3 mal mit je 150 ml Kaliumhydrogensulfatlösung (0,01 N) gewaschen, abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach erfolgter Filtration wurde das Filtrat eingeeengt und der Rückstand im Vakuum getrocknet (3 mbar, 40°C). Die anschließende Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: DCM/Methanol, 10:1;  $R_f=0.4$ ) zeigte eine reine Produktfraktion. Man erhielt somit 558 mg (0,99 mmol) 3-O-Biotinyl-2-N-dansyl-serin als gelben Feststoff.

Das erhaltene 3-O-Biotinyl-2-N-dansyl-serin wurde in seiner Gesamtheit in 8 ml trockenem Dichlormethan (DCM) gelöst und unter Rühren wurden 345 mg (0,99 mmol) 1-O-Tosyl-tetraethylenglykol, wie dieses auch im Rahmen des Beispiels 3 hergestellt wurde, 245 mg (1,2 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid DCC und 20 mg (0,16 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann bei Raumtemperatur für 72 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel: DCM/Methanol, 13:1;  $R_f=0.4$ ) gereinigt. Dabei wurden 292 mg (0,33 mmol) 3-O-Biotinyl-2-N-dansyl-serin-(1-O-tosyl-tetraethylenglykol)-ester als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 33 % erhalten. Der erhaltene Feststoff entspricht einem Stoff gemäß der Formel (Ib\*).

**Beispiel 6: Herstellen eines Stoffes gemäß der Formel (I), insbesondere gemäß der Formel (Ib) umfassend eine chemische Fluoreszenzfarbstoffgruppe X'**

292 mg (0,33 mmol) des gemäß Beispiel 5 hergestellten 3-O-Biotinyl-2-N-dansyl-serin-(1-O-tosyl-tetraethylenglykol)-ester wurden zusammen mit 80 mg (0,11 mmol) des gemäß Beispiel 2 hergestellten 2-((2,3-Bis(octadecyl)propyl)disulfanyl)-N,N-dimethylethanamin in 1 ml Trichlormethan gelöst. Das Gemisch wurde so für fünf Tage in einem Druckgefäß unter Argon bei 70°C unter Rühren

zur Reaktion gebracht und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel: DCM/Methanol, 5:1;  $R_f=0.2$ ) gereinigt und somit 88 mg (0,05 mmol) von 2-((2,3-Bis(octadecyloxy)propyl)disulfanyl)-N,N-dimethyl-N-(2-O-(3-O-biotinyl-2-N-dansyl-serin-1-yl)-tetraethylglykol-1-yl)ethan ammonium-tosylat gemäß der Formel (Ib) als gelber Feststoff erhalten.  
5 Dies entspricht einer Ausbeute von 50 %.

#### Beispiel 7: Herstellen eines Stoffes gemäß Formel (IIa\*)

5,75 g (29 mmol) 3-(Benzylthio)propan-1,2-diol wurden unter Argon in 140 ml trockenem Dimethylformamid gelöst. Man gab daraufhin 2,55g (37,8 mmol) Imidazol und 8,5 g (31 mmol) Tert-butyl-diphenyl-silylchlorid hinzu und rührte das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für  
10 72 Stunden. Anschließend wurden 30 ml Ethanol zugesetzt und das Gemisch durch Destillation vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 200 ml Chloroform aufgenommen und zweimal mit je 100 ml Wasser gewaschen. Die abgetrennte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeengt. Das erhaltene gelbliche Öl  
15 wurde mittels Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Trichlormethan/Methanol, 30:1;  $R_f=0.8$ ) gereinigt und die erhaltenen Fraktionen vom Lösungsmittel befreit. Man erhielt dabei 12,37 g (28mmol) 1-(Benzylthio)-3-(tert-butyldiphenylsilyloxy)propan-2-ol, was einer Ausbeute von 96 % entsprach. Der angebundene tert-butyldiphenylsilyloxy-Rest dient im Folgenden als Schutzgruppe, um eine spätere Anbindung einer chemischen Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' zu ermöglichen.

20 3,72 g (8,5 mmol) des erhaltenen 1-(Benzylthio)-3-(tert-butyldiphenylsilyloxy)propan-2-ol wurden zusammen mit 2,41 g (9,2 mmol) Triphenylphosphan und 1,39 g (9,4 mmol) Phthalimid in 68 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Zu der gerührten Lösung wurden unter Argonatmosphäre und bei Raumtemperatur 2,09 g (10,3 mmol) Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch ließ man so für 24 Stunden unter Rühren reagieren und entfernte  
25 anschließend das Lösungsmittel durch Destillation. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel Dichlormethan/Cyclohexan, 1:2;  $R_f=0.4$ ) gereinigt. Die vereinigten Fraktionen ergaben 3,2g (5,66 mmol) 2-(1-(Benzylthio)-3-(tert-butyldiphenylsilyloxy)propan-2-yl)isoindolin-1,3-dion als farbloses Öl. Dies entsprach einer Ausbeute von 68 %.

30 Das erhaltene 2-(1-(Benzylthio)-3-(tert-butyldiphenylsilyloxy)propan-2-yl)isoindolin-1,3-dion wurde in seiner Gesamtheit in 48 ml Ethanol (96 %) gelöst und es wurden bei Raumtemperatur (23°C) und unter Rühren 0,4 ml (6,6 mmol) Hydrazinhydrat (51 %) zugesetzt. Das Gemisch wurde unter Rückfluss für 2,5 Stunden zur Reaktion gebracht und hiernach für drei Tage bei Raumtemperatur unter Rühren fertig reagiert. Das Lösungsmittel wurde durch Destillation entfernt und der Rückstand mittels

Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel Dichlormethan/Methanol, 25:1;  $R_f=0.3$ ) gereinigt. Die erhaltenen Fraktionen ergaben 1,40 g (3,2 mmol) 1-(Benzylthio)-3-(tert-butyl-diphenylsilyloxy)propan-2-amin als farbloses Öl, was einer Ausbeute von 57 % entsprach.

77 mg (0,18 mmol) des erhaltenen 1-(Benzylthio)-3-(tert-butyl-diphenylsilyloxy)propan-2-amin wurden zusammen mit 40 mg (0,16 mmol) (+)-Biotin in 1,7 ml trockenem Dimethylformamid gelöst. Bei Raumtemperatur wurden daraufhin 38 ml (0,21 mmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), 38 mg (0,25 mmol) N-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und 31 ml (0,18 mmol) Diisopropylethylamin (DIPEA) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 24 Stunden gerührt. Anschließend setzte man 5 ml Toluol zu und entfernte das Lösungsmittel durch Destillation. Der Rückstand wurde im Vakuum (5 mbar, 40°C) getrocknet und in 20 ml Chloroform aufgenommen. Die organische Phase wurde drei mal mit je 20 ml Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach erfolgter Filtration wurde das Filtrat im Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und man erhielt 124 mg (0,18 mmol) N-(1-(Benzylthio)-3-(tert-butyl-diphenylsilyloxy)propan-2-yl)biotinamid als farblosen Feststoff in quantitativer Ausbeute.

Unter Argonatmosphäre wurden das N-(1-(Benzylthio)-3-(tert-butyl-diphenylsilyloxy)propan-2-yl)-biotinamid in 4 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und unter Trockeneiskühlung 50 ml flüssiger Ammoniak einkondensiert. Unter Rühren wurden im Argongegenstrom 100 mg (4,3 mmol) Natrium in kleinen Stücken zugegeben. Die dunkelblaue Lösung wurde unter Trockeneiskühlung (-78°C) für weitere 2,5 Stunden gerührt und dann mit 500 mg Ammoniumchlorid versetzt. Aus der farblosen Suspension wurde der Ammoniak im Argonstrom ausgetrieben und der erhaltene Rückstand mit 40 ml Wasser versetzt. Die Suspension wurde daraufhin mit molarer Salzsäurelösung angesäuert, so dass ein pH von 3 erhalten wurde und es wurden 100 ml Chloroform zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und im Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel: DCM/Methanol, 10:1;  $R_f=0.3$ ) gereinigt. Es wurden 95 mg (0,17 mmol) 1-Mercapto-3-(tert-butyl-dicyclohexa-2,5-dienylsilyloxy)propan-2-biotinylamid als farbloses Öl mit 55 % Ausbeute erhalten.

Das N-(1-Mercapto-3-(tert-butyl-dicyclohexa-2,5-dienylsilyloxy)propan-2-yl)-biotinamid entspricht dem Stoff gemäß der Formel (IIa\*), wobei 2-biotinyl- der chemischen Gruppe Y entspricht, die chemische Gruppe  $FG_1$  Wasserstoff entspricht und der 3-(tert-butyl-dicyclohexa-2,5-dienylsilyloxy)propan (...) amid-Rest der chemischen Gruppe X umfassend die Schutzgruppe 3-(tert-butyl-dicyclohexa-2,5-dienylsilyloxy) entspricht.

**Beispiel 8: Herstellen eines Stoffes gemäß Formel (I) insbesondere gemäß der Formel (Ic)**

91mg (0,15 mmol) von 3-Mercapto-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan aus dem Beispiel 1 wurden unter Argon in 3,4 ml trockenem Dichlormethan und 1,2 ml trockenem Acetonitril gelöst und unter Rühren 26 mg (0.15mmol) 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) zugegeben.

Die rote Lösung wurde 1,5 h bei Raumtemperatur (23°C) gerührt und dann die Temperatur auf 60°C angehoben. Nachdem sich die Lösung entfärbt hatte, wurden die 95 mg (0,17 mmol) des gemäß Beispiel 7 erhaltenen N-(1-Mercapto-3-(tert-butyldicyclohexa-2,5-dienylsilyloxy)propan-2-yl)-biotinamid zugesetzt und die Lösung bei Raumtemperatur (23°C) für 24 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Destillation entfernt und der erhaltene Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Gradient: Dichlormethan → Dichlormethan /Methanol, 10:1;  $R_f=0.5$ ) gereinigt. Hierdurch wurden 76 mg (0,064 mmol) (3-(Tert-butyldicyclohexa-2,5-dienylsilyloxy)propan-2-biotinylamid-1-yl)-3-dithio-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 38 % erhalten.

Dieses (3-(Tert-butyldicyclohexa-2,5-dienylsilyloxy)propan-2-biotinylamid-1-yl)-3-dithio-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan entspricht bereits dem Vorläufer des Stoffes gemäß Formel (Ic), wobei aber durch die Tert-butyldicyclohexa-2,5-dienylsilyloxy-Gruppe noch eine Schutzgruppe vorhanden ist, die im Folgenden noch durch eine chemische Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' zu ersetzen ist.

Das erhaltene (3-(Tert-butyldicyclohexa-2,5-dienylsilyloxy)propan-2-biotinylamid-1-yl)-3-dithio-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan wurde in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst und es wurden unter Rühren 50 mg (1.35 mmol) Ammoniumfluorid zugegeben. Zu der Suspension wurde anschließend 1 ml (1 mmol) einer 1 molaren Tetra-n-butylammonium-fluorid (TBAF) Lösung in Tetrahydrofuran getropft und das Reaktionsgemisch für drei Tage bei Raumtemperatur (23°C) gerührt. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen worden ist, wurde der Rückstand durch Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Gradient: Dichlormethan → Dichlormethan /Methanol, 12:1;  $R_f=0.3$ ) gereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden vom Lösungsmittel befreit und es wurden somit 40 mg (0,042 mmol) (3-Hydroxy-propan-2-biotinylamid-1-yl)-3-dithio-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan als farbloser Feststoff isoliert. Dies entsprach einer Ausbeute von 66 %.

Hiermit wurde die vorgenannte Schutzgruppe zu Gunsten eines Wasserstoffatoms ersetzt, so dass die nunmehr vorhandene Hydroxygruppe für die weitere Reaktion mit der chemischen Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' geeignet ist.

Die chemische Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' wurde erhalten, indem zunächst 5g (18.5 mmol) Dansylchlorid in 50 ml trockenem Pyridin suspendiert und 1,63 g (18,5mmol) N,N-Dimethylaminoethylenamin langsam zugegeben wurden. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden gerührt und anschließend das Lösungsmittel durch Destillation entfernt. Anschließend wurde der Rückstand in 100 ml Chloroform aufgenommen und mit 100 ml

einer Ammoniumhydroxidlösung (2.5 %) versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach erfolgter Filtration wurde das Filtrat vom Lösungsmittel befreit und das entstandene gelbe Öl im Vakuum getrocknet (4 mbar, 40°C). Es wurden somit 5,26 g (16,4 mmol) 5-(Dimethylamino)-N-(2-(dimethylamino)ethyl)naphthalen-1-sulfonamid mit 89 %  
5 Ausbeute erhalten. Das 5-(Dimethylamino)-N-(2-(dimethylamino)ethyl)naphthalen-1-sulfonamid wurde zusammen mit 2,95 g (21,3 mmol) Kaliumcarbonat in 40 ml trockenem Ethanol suspendiert. Unter Rühren wurden dieser Suspension 2,66 g (21,3 mmol) 2-Bromethanol zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für drei Tage unter Rückfluss bei 90°C zur Reaktion gebracht und das Lösungsmittel anschließend im Rotationsverdampfer abgezogen. Der erhaltene Rückstand wurde  
10 mittels Säulenchromatographie (Säulenmaterial: ALOX 50-200 $\mu$  neutral; Laufmittel CHCl<sub>3</sub>/Methanol/25%NH<sub>3</sub>, 10:1:0.1; R<sub>f</sub>=0.2) gereinigt und aus den vereinigten Fraktionen ergaben sich 2,65 g (5,9 mmol) 2-(5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)-N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethylethanammoniumbromid als oranger Feststoff in einer Ausbeute von 36 %. 1 g des erhaltenen 2-(5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)-N-(2-hydroxyethyl)-N,N-  
15 dimethylethanammoniumbromid wurden zusammen mit 540 mg (5.4 mmol) Succinsäureanhydrid und 15 mg (0.12 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) in 10 ml trockenem Pyridin suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter Schutzgas (Argon) auf 70°C erwärmt und für drei Tage gerührt. Die Lösung wurde dann auf Raumtemperatur (23°C) abgekühlt und 20 ml Toluol hinzugegeben. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mittels Säulenchromatographie  
20 (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel: Dichlormethan/Methanol/Ameisensäure, 5:1:0.2; R<sub>f</sub>=0.3) gereinigt. Dabei erhielt man nach Entfernen des Lösungsmittels 1.1g (2,0 mmol) 2-(5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)-N-(2-O-succinyl-ethyl)-N,N-dimethylethanammoniumbromid als gelbgrünen, hydroskopischen Feststoff mit einer Ausbeute von 90 % als chemische Fluoreszenzfarbstoffgruppe X'.

25 46 mg (0,084 mmol) dieser chemischen Fluoreszenzfarbstoffgruppe X' in Form des 2-(5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)-N-(2-O-succinyl-ethyl)-N,N-dimethylethanammoniumbromid wurden dann mit 40 mg (0,042 mmol) des zuvor hergestellten (3-Hydroxy-propan-2-biotinylamid-1-yl)-3-dithio-1,2-bis-O-(octadecyl)-propan in 1,1 ml Dichlormethan gelöst und es wurden unter Argon 181 mg (0,88 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 37 mg  
30 (0,30 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Druckgefäß verschlossen und für 14 Tage bei 40°C gerührt. Nachdem das Lösungsmittel durch Destillation abgezogen worden ist, wurde der Rückstand durch Säulenchromatographie (Säulenmaterial: Kieselgel; Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 5:1; R<sub>f</sub>=0.2) gereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden vom Lösungsmittel befreit und es wurden somit 34 mg (0,023 mmol)  
35 1-O-(2-Dansylamid-N,N-dimethylethanammoniumbromid-N-(ethyl-O-succinyl))-2-N-biotinyl-3-

((2,3-bis(octadecyloxy)propyl)disulfanyl)-2-aminopropanol gemäß der Formel (Ic) als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 55 % erhalten.

**Beispiel 9: Herstellen von erfindungsgemäßen Wirkstoffträgern umfassend Stoffe gemäß Formel (I)**

5 Es wurden Stammlösungen von den Stoffen erhalten aus den Beispielen 4, 6 und 8 hergestellt, indem die Stoffe gemäß der Beispiele 4 und 6 in einer Chloroform/Methanol Lösung (5:1) gelöst wurden, bzw. der Stoff gemäß Beispiel 8 in Chloroform gelöst wurde.

Zu diesen Stammlösungen wurden dann weitere Stoffe gemäß der Tabelle 1 mit den dort aufgeführten molaren Anteilen gegeben, wobei im Fall der Zusammensetzung I und II die weiteren Stoffe ebenfalls  
10 in Chloroform gelöst waren und im Fall der Zusammensetzungen III bis VIII die weiteren Stoffe ebenfalls in einer Chloroform/Methanol Lösung (5:1) gelöst waren.

Das in der Tabelle 1 aufgeführte L- $\alpha$ -phosphatidylcholin (eggPC), das 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) und das Ammonium-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rh-DPPE) wurden jeweils käuflich (Fa.  
15 Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) erworben.

Die Tabelle 1 gibt in der letzten Spalte weiter darüber Auskunft, ob in die jeweiligen, aus den Zusammensetzungen I bis VII erhaltenen unilamellaren Vesikel (Wirkstoffträger) ein Wirkstoff eingebracht wurde oder nicht. Exemplarisch ist in den hier ausgeführten Versuchen Calcein als  
20 spektroskopisch einfach nachzuweisende, wasserlösliche Substanz in Ersatz zu einem pharmazeutisch aktiven Wirkstoff verwendet worden.

Die Zusammensetzungen I bis VII wurden in einem Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel(-gemisch) befreit, so dass sich auf der Wand des Glaskolbens die Feststoffmischungen aus den Stoffen als Film niederschlugen.

25

**Tabelle 1: Zusammensetzungen I bis VII gemäß Beispiel 9**

	Molarer Anteil [%]						
#	Stoff (Ia) 377	Stoff (Ib) 392	Stoff (Ic) 325	eggPC	DOPE	Rh- DPPE	Calcein

I	0	0	10	89,9	0	0,1	Nein
II	0	0	0	99,9	0	0,1	Nein
III	20	0	0	30	50	0	Ja
IV	10	0	0	30	60	0	Ja
V	0	0	0	40	60	0	Ja
VI	0	10	0	90	0	0	Nein
VII	0	10	0	89	0	1	Nein

Im Fall der Zusammensetzungen I und II wurde der niedergeschlagene Film mit einer 176 mM Saccharose-Lösung enthaltend 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) in 10 mM Konzentration und aufweisend einen pH-Wert von 7,4 bei 40°C aufgenommen. Die entstandene Suspension wurde fünf Einfrier- und Auftauvorgängen unterworfen. Das Einfrieren geschah jeweils durch Eintauchen des Glaskolbens in eine Isopropanol-Trockeneismischung und das Auftauen jeweils durch Eintauchen in ein Wasserbad bei 50°C. Hiernach wurde die Suspension 10 mal durch einen Polycarbonatfilter mit 100 nm Porendurchmesser (Fa. Nucleopore GmbH) bei einer Temperatur von 40°C geleitet und die somit entstandenen unilamellaren Vesikel (Wirkstoffträger) wurden für eine Stunde bei 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet der erhaltenen Wirkstoffträger wurde in 100 mM Kaliumchloridlösung mit 10 mM HEPES bei pH 7,4 resuspendiert.

Im Fall der Zusammensetzungen III bis VII wurden die niedergeschlagenen Filme in Cyclohexan (im Fall der Zusammensetzungen III bis V Cyclohexan mit weiteren 5 Vol.-% Ethylacetat) aufgenommen, die Lösungen in Glasröhren überführt bei -80°C gefroren und über Nacht lyophilisiert.

Am nächsten Tag wurde den Zusammensetzungen III bis V eine auf 70°C vorgewärmte 70 mM Calcein-Lösung mit 10 mM HEPES, 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bei pH 7,4 zugegeben. Die so entstandenen Suspensionen wurden in gleicher Weise, wie zuvor jene der Zusammensetzungen I und II fünf Einfrier- und Auftauvorgängen unterworfen, wobei jedoch das Auftauen jeweils mit einem 70°C warmen Wasserbad erfolgte. In ebenso gleicher Weise erfolgte ein 10-maliges Durchleiten der Suspension durch einen Polycarbonatfilter. Mit den Zusammensetzungen VI und VII wurde analog Verfahren, mit dem einzigen Unterschied, dass keine Calceinlösung, sondern die o. g. Kaliumchloridlösung verwendet wurde.

Um die aus den Zusammensetzungen III bis V erhaltenen unilamellaren Vesikel (Wirkstoffträger), die mit Calcein beladen sind, von überschüssigem Calcein, das sich nicht im Inneren der Wirkstoffträger

befindet zu befreien, wurde das Permeat der vorgenannten Filtration über eine in einer Zentrifugeneinheit befindliche Trennsäule geleitet (Säule: Sephadex G 50, Fa. Quiagen; Zentrifugation: 3 Minuten bei 530 x g).

#### **Beispiel 10: Nachweis der Ausbildung unilamellarer Vesikel (Wirkstoffträger) ohne Wirkstoff**

5 Die aus der Zusammensetzung VII erhaltenen unilamellaren Vesikel (Wirkstoffträger) wurden in den jeweiligen Lösungen in eine temperaturkontrollierte spektroskopische Messzelle mit Rührer (Fa. Aminco Typ: Bowman series 2) eingebracht und im Bereich der Wellenlängen von 350 bis 650 nm unter Anregung bei 330 nm hinsichtlich des emittierten Fluoreszenzlichtes vermessen.

Die Zusammensetzung VII weist in dem verwendeten Stoff (Ib) mit dem Dansyl-Rest eine fluoreszierende Gruppe auf und des weiteren in dem weiteren Stoff Ammonium-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-lissamin rhodamin B sulfonyl) (Rh-DPPE) mit der Rhodamin-Gruppe eine weitere fluoreszenzaktive Gruppe. Diese beiden fluoreszierenden Gruppen können, wenn diese in enger räumlicher Nähe zu einander befindlich sind einen sogenannten Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen dem Dansyl-Rest und dem Rhodamin aufweisen, der dazu führt, dass die Fluoreszenz des Dansyl abfällt bzw. verschwindet und – über FRET – (nur noch) die Rhodaminfluoreszenz zu sehen ist, welche bei 590 nm zu erkennen wäre.

Demzufolge wurden die Fluoreszenzsignale der aus der Zusammensetzung VII erhaltenen unilamellaren Vesikel (Wirkstoffträger) vermessen und mit den Fluoreszenzsignalen derselben Probe verglichen, nachdem diese mit 10 µl an 20 %-igem Polyethylenglykol-p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl-ether (Triton X 100) versetzt wurde. Triton X 100 ist ein nichtionisches Detergenz, das nach  
20 allgemeinem Wissen unilamellare Vesikel auflöst.

Aus der Fig. 1 ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzsignale der aus der Zusammensetzung VII erhaltenen unilamellaren Vesikel (Wirkstoffträger) direkt nach ihrer Herstellung (A) und mindestens über einen Zeitraum von zwei Stunden (B) bei 590 nm einen unveränderlichen Messausschlag - und insbesondere keinen Messausschlag bei 520 nm aufweisen, wie er für einen Dansyl-Rest eindeutig wäre - aufweist. Direkt nach der Zugabe von Triton X 100 erkennt man die getrennten  
25 Fluoreszenzsignale des Dansyl-Restes und des Rhodamin (C).

Damit ist eindeutig, dass vor der Zugabe von Triton X-100 unilamellare Vesikel im Sinne der erfindungsgemäßen Wirkstoffträger vorgelegen haben.

#### **30 Beispiel 11: Freisetzung von Wirkstoff aus unilamellaren Vesikel (Wirkstoffträgern)**

Es wurden die aus den Zusammensetzungen III bis IV erhaltenen unilamellaren Vesikel (Wirkstoffträger) in ähnlicher Weise, wie im vorigen Beispiel 10 untersucht, mit dem Unterschied,

dass nun nicht bei 330 nm angeregt wurde, sondern bei 492 nm. Dies ist die Wellenlänge des ungefähren Anregungsmaximums von Calcein.

Des weiteren wurden Versuche bei verschiedenen Temperaturen (30°C, 35°C und 40°C) unternommen und es wurde anstelle des nichtionischen Detergenz tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) als Reduktionsmittel für die Disulfidgruppe eingesetzt. Somit wurde die tatsächliche Freisetzung durch Spaltung der Disulfidgruppe untersucht.

Die Ergebnisse der Versuche mit den Zusammensetzungen III sind in der Fig. 2 dargestellt. Die Ergebnisse mit den Zusammensetzungen IV sind in der Fig. 3 dargestellt. Aufgetragen ist jeweils die relative Fluoreszenzintensität ( $F^*$ ) über der Messzeit ( $t$ ) für die Messungen bei 30°C, 35°C und 40°C. Relative Fluoreszenzintensität ( $F^*$ ) bedeutet hier jeweils die Fluoreszenzintensität, die gemessen wurde, bezogen auf einen theoretischen maximalen Fluoreszenzintensitätswert des reinen Calcein in Lösung.

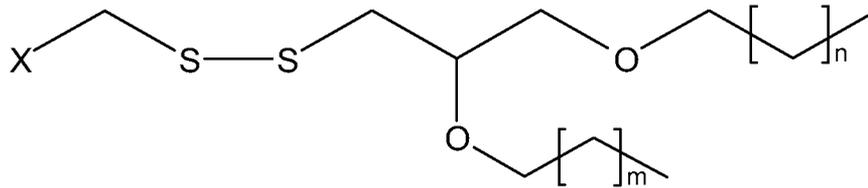
Man erkennt in der Fig. 2, dass bei einer Temperatur von 30°C (IIIa) über einen Zeitraum von bis zu 800 s noch keine befriedigende Freisetzung erzielt wird. Bei einer Temperatur von 35°C (IIIb) findet eine spontane Freisetzung etwa binnen der ersten 300 s statt. Bei einer Temperatur von 40°C (IIIc) findet eine spontane Freisetzung bereits binnen der ersten 200 s statt.

Man erkennt in der Fig. 3, dass bei einer Temperatur von 30°C (IVa) über einen Zeitraum von bis zu 1200 s noch keine befriedigende Freisetzung erzielt wird. Bei einer Temperatur von 35°C (IVb) findet eine Freisetzung etwa binnen der ersten 800 s statt. Bei einer Temperatur von 40°C (IVc) findet eine spontane Freisetzung bereits binnen der ersten 500 s statt.

Da die Zusammensetzung IV im Gegensatz zu jener gemäß III einen Anteil von nur 10 mol-% des Stoffes gemäß Formel (1a) enthält, ist ebenso offensichtlich, dass dessen Anwesenheit für die verbesserte, spontane Freisetzung ursächlich ist. Darüber hinaus wird in allen Fällen die Freisetzung besonders positiv bei Temperaturen erwirkt, wie sie im menschlichen Körper üblich sind. Die besonders schnelle Freisetzung findet im Bereich von 35°C bis 40 °C statt.

**Patentansprüche**

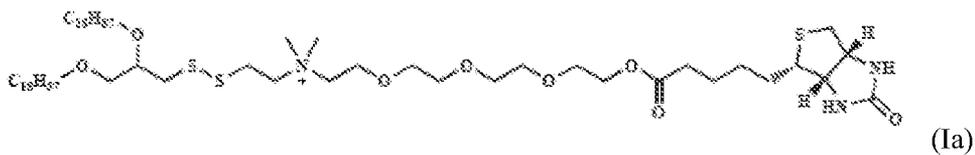
1. Stoffe geeignet zur Herstellung von Wirkstoffträgern in Form eines Liposoms gemäß der Formel (I)



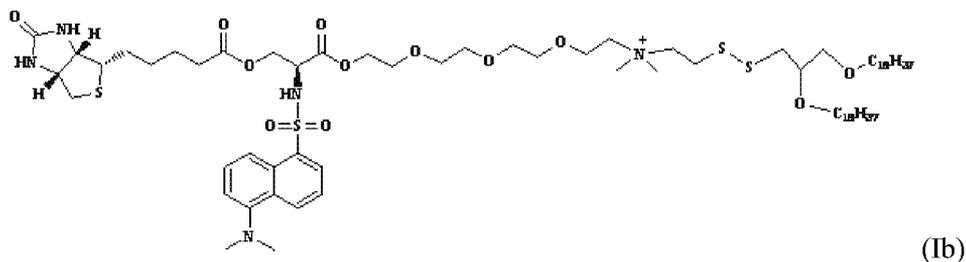
(I)

- 5 **dadurch gekennzeichnet**, dass die Stoffe gemäß Formel (I)
- (a) in X auf der einen Seite der Disulfidgruppe eine hydrophile chemische Gruppe umfassend mindestens fünf Kohlenstoffatome und umfassend mindestens eine Ethergruppe und/oder Aminogruppe oder Ammoniumgruppe aufweisen, und wobei
- (b) auf der anderen Seite der Disulfidgruppe eine hydrophobe Gruppe befindlich ist, in der n und m unabhängig von einander eine natürliche Zahl von 1 bis 30 sind, wobei aber die Summe aus n und m mindestens 16 beträgt.
- 10
2. Stoffe gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Reste mit n, m Kohlenstoffatomen einfach oder mehrfach ungesättigte Reste sind.
3. Stoffe gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Reste mit n, m Kohlenstoffatomen gesättigte Kohlenwasserstoffreste sind.
- 15
4. Stoffe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die chemische Gruppe X mindestens acht Kohlenstoffatome umfasst.
5. Stoffe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die chemische Gruppe X auch mindestens eine Carbonsäureestergruppe umfasst.
- 20
6. Stoffe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die chemische Gruppe X entweder mindestens zwei Ethergruppen oder mindestens eine Aminogruppe oder Ammoniumgruppe und mindestens zwei Carbonsäureestergruppen umfasst.
7. Stoffe gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die mindestens eine Aminogruppe oder Ammoniumgruppe der chemischen Gruppe X eine quarternäre Ammoniumgruppe ist.
- 25

8. Stoffe gemäß Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Stoff gemäß der Formel (I) eine positive Ladung trägt und in Kombination mit mindestens einem einfach oder mehrfach negativ geladenen Gegenion vorliegt.
9. Stoffe gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die chemische Gruppe X mindestens drei Ethergruppen umfasst.
10. Stoffe gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die chemische Gruppe X an eine chemische Gruppe Y angebunden ist, wobei die chemische Gruppe Y eine chemische Gruppe ausgewählt aus der Liste bestehend aus Biotin, Protein, Peptid, Nucleinsäure, Nucleosid und Glykogruppe ist.
11. Stoffe gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die chemische Gruppe X über eine Carbonsäureestergruppe an die chemische Gruppe Y angebunden ist.
12. Stoffe gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die chemische Gruppe X zwei Carbonsäureestergruppen, eine erste Amingruppe oder Ammoniumgruppe und eine zweite Amingruppe oder Ammoniumgruppe umfasst, wobei die chemische Gruppe Y an die chemische Gruppe X über eine Amidbindung angebunden ist.
13. Stoffe gemäß einem der Ansprüche 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie die chemische Formel (Ia)



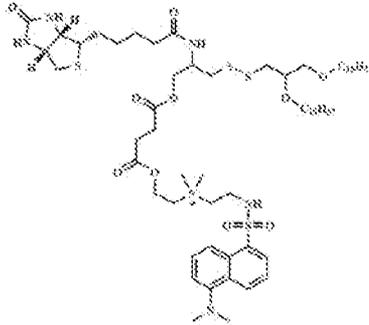
oder (Ib)



20

aufweisen.

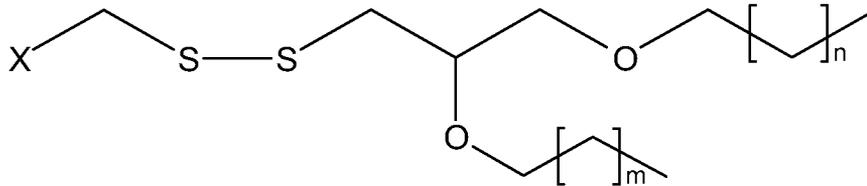
14. Stoff gemäß Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass er die chemische Formel (Ic)



(Ic)

aufweist.

15. Selbstorganisierter Wirkstoffträger in Form eines Liposoms, **dadurch gekennzeichnet**, dass dieser Wirkstoffträger mindestens einen Stoff gemäß der Formel (I)



(I)

umfasst, wobei der mindestens einen Stoff gemäß der Formel (I)

- (a) in X einer chemischen Gruppe umfassend mindestens fünf Kohlenstoffatome und umfassend mindestens eine Ethergruppe und/oder Amingruppe oder Ammoniumgruppe aufweisen, wobei
- (b) n und m unabhängig von einander eine natürliche Zahl von 1 bis 30 ist, wobei aber die Summe aus n und m mindestens 16 beträgt.
16. Selbstorganisierter Wirkstoffträger gemäß Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass er mindestens noch einen weiteren Stoff, mit mindestens einer chemischen Gruppe mit lipophilen Eigenschaften und mindestens einer chemischen Gruppe mit hydrophilen Eigenschaften aufweist.
17. Selbstorganisierter Wirkstoffträger gemäß Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass der weitere Stoff, mit mindestens einer chemischen Gruppe mit lipophilen Eigenschaften und mindestens einer chemischen Gruppe mit hydrophilen Eigenschaften ein Lipid ist.

18. Selbstorganisierter Wirkstoffträger gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Lipid ausgewählt ist aus der Liste bestehend aus L- $\alpha$ -phosphatidylcholin, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin und Ammonium-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-lissamin rhodamin B sulfonyl).
- 5 19. Verfahren zur Freisetzung eines Wirkstoffs aus den Wirkstoffträgern gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass die im Wirkstoffträger enthaltenen amphiphilen Stoffe gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 an ihrer Disulfidgruppe chemisch in einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil gespalten werden.

**Figuren:**

Fig. 1

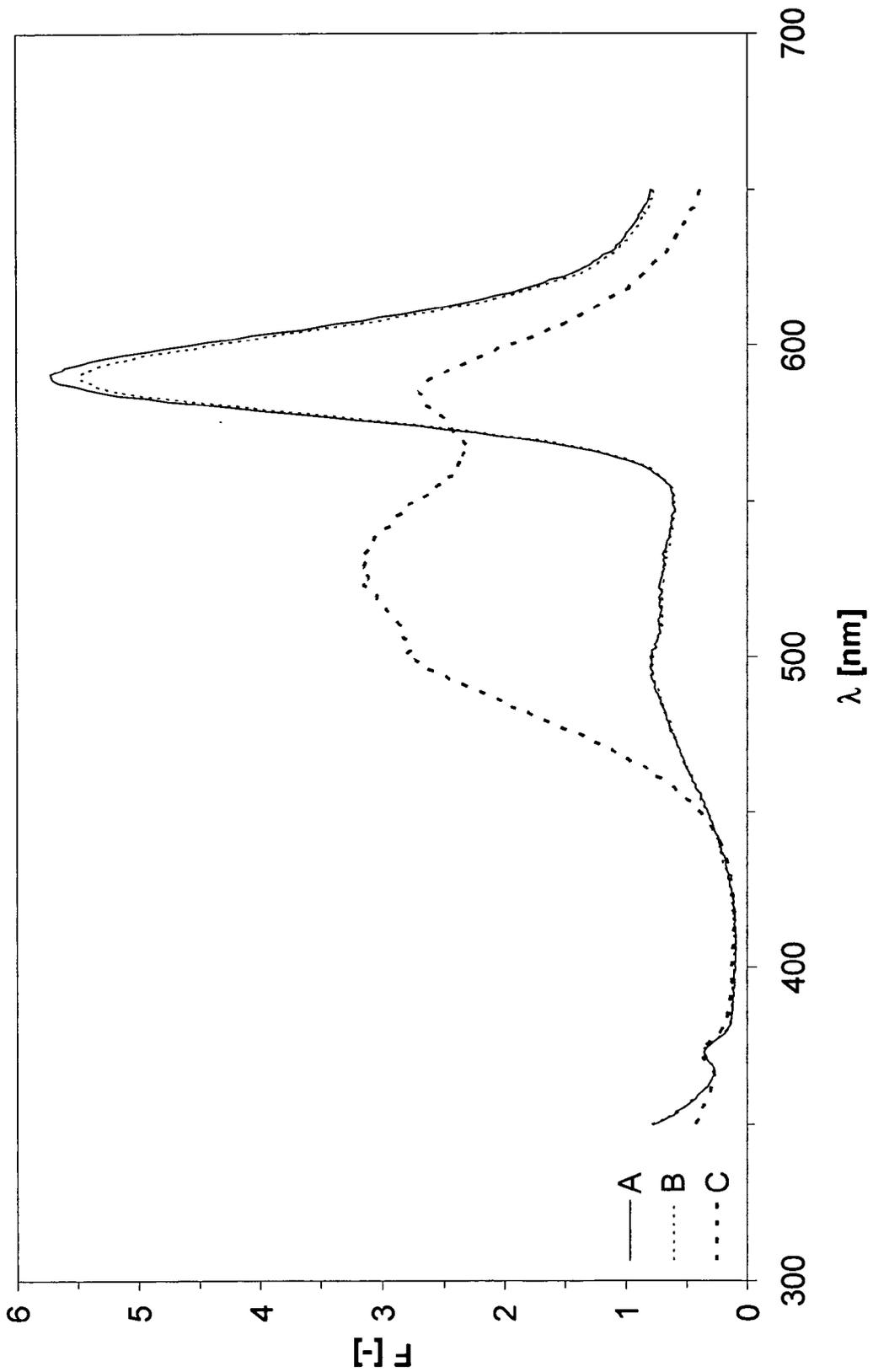


Fig. 2

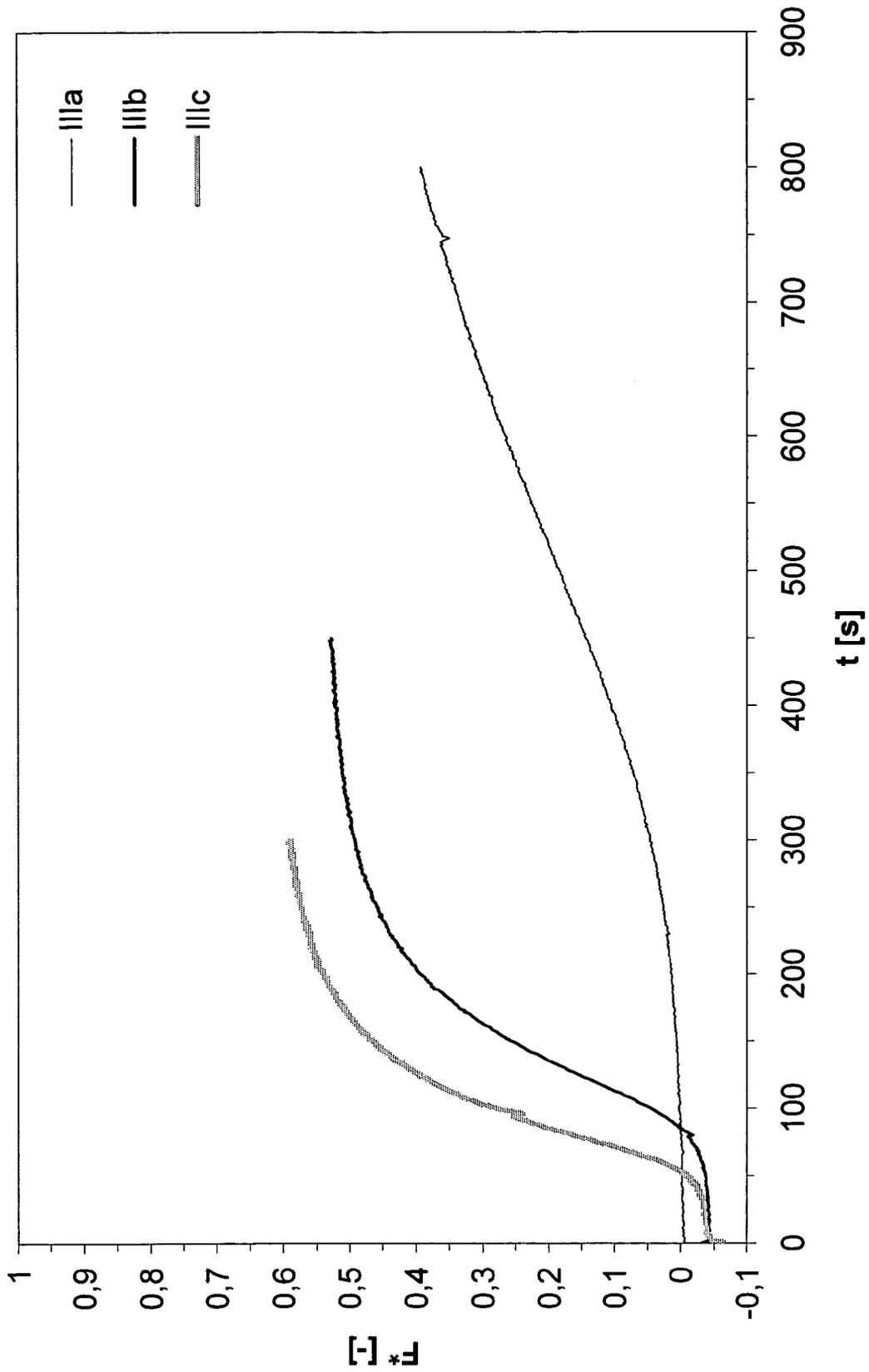
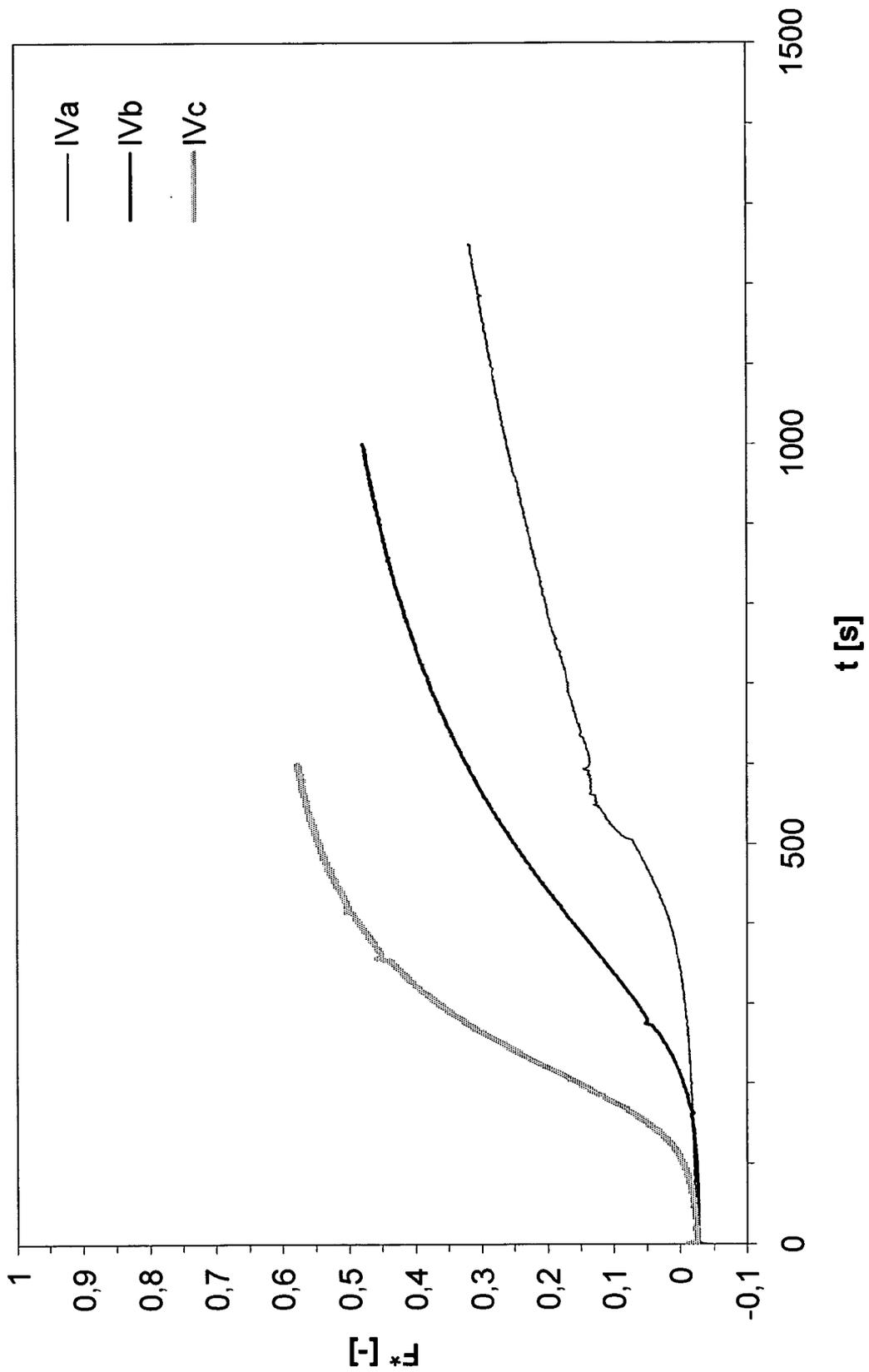


Fig. 3:



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2010/064272
---

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. A61K9/127 C07D495/04  
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 A61K C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MUELLER C E ET AL: "AMPHIPHILE UNSYMMETRISCHE DISULFIDE ALS LIPOSOMENBAUSTEINE", ARCHIV DER PHARMAZIE, WILEY - VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 322, no. 6, 1 January 1989 (1989-01-01), pages 343-350, XP000981914, ISSN: 0365-6233	1-12, 15-19
A	the whole document ----- -/--	13,14

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents :
- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
  - \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
  - \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
  - \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
  - \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
  - \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
  - \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
  - \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
  - \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  <b>15 December 2010</b>	Date of mailing of the international search report  <b>21/12/2010</b>
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  <b>Mooren, Nicolai</b>
--	--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2010/064272

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MULLER C E ET AL: "Lipophilic disulfide prodrugs - syntheses and disulfide bond cleavage", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 57, no. 1, 15 December 1989 (1989-12-15), pages 41-47, XP023845146, ISSN: 0378-5173, DOI: DOI:10.1016/0378-5173(89)90261-5 [retrieved on 1989-12-15] the whole document</p> <p>-----</p>	1-19

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2010/064272
---

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 INV. A61K9/127 C07D495/04  
 ADD.

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
 A61K C07D

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BEILSTEIN Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MUELLER C E ET AL: "AMPHIPHILE UNSYMMETRISCHE DISULFIDE ALS LIPOSOMENBAUSTEINE", ARCHIV DER PHARMAZIE, WILEY - VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, Bd. 322, Nr. 6, 1. Januar 1989 (1989-01-01), Seiten 343-350, XP000981914, ISSN: 0365-6233	1-12, 15-19
A	das ganze Dokument ----- -/--	13,14

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen  Siehe Anhang Patentfamilie

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</li> <li>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</li> <li>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</li> <li>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</li> <li>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</li> <li>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</li> <li>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</li> <li>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</li> <li>*&amp;* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</li> </ul> |
|---|--|

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <p style="text-align: center; font-weight: bold;">15. Dezember 2010</p>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  <p style="text-align: center; font-weight: bold;">21/12/2010</p>
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  <p style="text-align: center; font-weight: bold;">Mooren, Nicolai</p>

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/064272

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>MULLER C E ET AL: "Lipophilic disulfide prodrugs - syntheses and disulfide bond cleavage", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, Bd. 57, Nr. 1, 15. Dezember 1989 (1989-12-15), Seiten 41-47, XP023845146, ISSN: 0378-5173, DOI: DOI:10.1016/0378-5173(89)90261-5 [gefunden am 1989-12-15] das ganze Dokument</p>	1-19