



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 22 017 T2** 2005.11.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 105 101 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 22 017.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/18308**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 943 687.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/10533**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.08.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.03.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.06.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **17.11.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.11.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 9/16**

A61K 31/495, A61K 9/51

(30) Unionspriorität:

135708 18.08.1998 US

(73) Patentinhaber:

**Southern Research Institute, Birmingham, Ala.,
US**

(74) Vertreter:

Eisenführ, Speiser & Partner, 80335 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**BARROW, W., William, Hoover, US; BARROW, L.,
Esther, Hoover, US; QUENELLE, C., Debra,
Wilsonville, US; WINCHESTER, A., Gary,
Birmingham, US; STAAS, K., Jay, Alabaster, US**

(54) Bezeichnung: **ARZNEIMITTEL UND VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON INTRAZELLULÄREN INFEKTIONEN**

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

[0001] Die Erfindung wurde mit Unterstützung der Regierung unter Vertrag AI38185 der vom National Institutes of Health verliehen wurde, gemacht. Die Regierung hat Rechte an der Erfindung.

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0002] Die Erfindung betrifft allgemein Verfahren und Zusammensetzungen, um intrazelluläre Infektionen zu behandeln, und Mikrokügelchenpräparate, die für eine solche Behandlung verwendet werden.

Stand der Technik

[0003] Krankheiten, die mit intrazellulären Infektionen verbunden sind, sprechen oft nicht adäquat auf übliche Wirkstoffbehandlungspläne an, was verursacht, dass viele Patienten unter Rückfällen leiden, nachdem sie gegen solche Krankheiten behandelt wurden. Eine Vielzahl von Wirkstoffen werden verwendet, um Krankheiten zu behandeln, die mit intrazellulären Infektionen verbunden sind. Außerdem wird viel daran geforscht, neue Wirkstoffe zu finden, um solche Krankheiten zu behandeln. Übliche Wirkstoffe und Wirkstoffbehandlungen sind jedoch oft begrenzt durch die Toxizität, die für viele Wirkstoffe sehr nahe der minimalen Hemmkonzentration des Wirkstoffs liegt, was ein enges Fenster für die Wirkstoffwirksamkeit ergibt. Behandlungspläne beinhalten typischerweise auch Mehrfachdosen, was das Risiko des Versagens einer Behandlung erhöht, die durch Nichteinhaltung des Plans durch den Patienten verursacht wird.

[0004] Patentedokument WO-A-98/24427 offenbart eine Behandlung von entzündlichen Krankheiten unter Verwendung von bimodalen Populationen von mit Wirkstoff beladenen Mikroteilchen (**Fig. 54 bis 57**). Die Methode ist geeignet zur Behandlung von Tuberkulose (S. 69).

[0005] Die vorliegende Erfindung liefert einen einzigartigen Plan von Zusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung aller intrazellulären Infektionen unter Verwendung von Wirkstoff, der für die jeweilige Krankheit geeignet ist. Die Maßnahmen der Erfindung bringen Wirkstoffe gezielt zu infizierten Zellen und sind erfolgreicher bei der Behandlung von intrazellulären Infektionen, als übliche Behandlungsmaßnahmen. Der Behandlungsplan bzw. die Behandlungsmaßnahmen der Erfindung vermindern intrazelluläre Zahlen besser als äquivalente Dosen, die bei üblichen Behandlungsplänen verabreicht werden. Das System von Zusammensetzungen und Methoden erfordert auch weniger Verabreichungen, was somit das Risiko, dass der Patient sich nicht daran hält, minimiert.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Gemäß dem Zweck/den Zwecken der Erfindung, wie sie hier ausgeführt und breit beschrieben werden, betrifft die Erfindung in einem Aspekt die Verwendung einer Zusammensetzung, wie in Anspruch 1 definiert.

[0007] Die Erfindung liefert einen Kit zur Behandlung einer intrazellulären Infektion bei einem Patienten, der (a) eine wirksame Menge eines geeigneten Wirkstoffs, der in ersten biokompatiblen Mikrokügelchen enthalten ist, die den geeigneten Wirkstoff bei Verabreichung in einer ersten wirksamen Rate freisetzen, und (b) eine wirksame Menge eines geeigneten Wirkstoffs, der in zweiten biokompatiblen Mikrokügelchen enthalten ist, die den geeigneten Wirkstoff bei Verabreichung in einer zweiten wirksamen Rate freisetzen, enthält, wobei die ersten Mikrokügelchen einen Durchmesser von etwa 1 bis etwa 10 µm haben und die zweiten Mikrokügelchen einen Durchmesser von mehr als etwa 10 µm haben, und wobei der Wirkstoff für die ersten und zweiten Mikrokügelchen gleich oder verschieden sein kann.

[0008] In einer weiteren Ausführungsform liefert die Erfindung eine Zusammensetzung, um die Toxizität eines geeigneten Wirkstoffs zu vermindern, der verwendet wird, um intrazelluläre Infektionen zu behandeln, bei der eine erste wirksame Menge des geeigneten Wirkstoffs in ersten biokompatiblen Mikrokügelchen verkapselt ist, die einen Durchmesser von etwa 1 bis etwa 10 µm haben und die Mikrokügelchen an ein Wesen bzw. Tier verabreicht werden, wobei die ersten Mikrokügelchen den geeigneten Wirkstoff bei Verabreichung in einer ersten wirksamen Rate freisetzen.

[0009] In einer weiteren Ausführungsform liefert die Erfindung eine Wirkstoffformulierung mit verminderter To-

xizität, die eine erste wirksame Menge des geeigneten Wirkstoffs in ersten biokompatiblen Mikrokügelchen verkapselt enthält, die einen Durchmesser von etwa 1 bis etwa 10 µm haben.

[0010] Weitere Aspekte und Vorteile der Erfindung werden teilweise in der Beschreibung, die folgt, angegeben und ergeben sich teilweise aus der Beschreibung oder zeigen sich bei Durchführung der Erfindung. Die Vorteile der Erfindung werden mithilfe der Elemente und Kombinationen, die speziell in den beigefügten Ansprüchen ausgeführt sind, realisiert und erreicht. Es versteht sich, dass sowohl die vorhergehende allgemeine Beschreibung als auch die folgende detaillierte Beschreibung nur beispielhaft und erklärend sind und nicht die Erfindung, wie sie beansprucht wird, beschränken.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0011] Die beigefügten Zeichnungen, die in dieser Schrift enthalten sind und einen Teil davon bilden, zeigen verschiedene Ausführungsformen der Erfindung und zusammen mit der Beschreibung dienen sie dazu, die Prinzipien der Erfindung zu erklären.

[0012] [Fig. 1](#) zeigt die in-vitro-Freisetzungseigenschaften der mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchenformulierungen 4, 5 und 6 von Beispiel 1 über einen Zeitraum von 6 Tagen in Aufnahme Flüssigkeit.

[0013] [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) zeigen die Größenverteilung der mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchenformulierungen 5 bzw. 6 aus Beispiel 1, mit einem Malvern-Teilchengrößenanalysegerät bestimmt.

[0014] Die [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) zeigen Rasterelektronenmikrografien der mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchenformulierung 5 von Beispiel 1. Die Querbalken zeigen 10 µm.

[0015] [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) zeigen die Wirksamkeit der mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchenformulierung 5 von Beispiel 1, um intrazelluläres Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv in monocytischen Maus-J774- bzw. Human-MM6-Zelllinien zu reduzieren.

[0016] [Fig. 5A](#) bis [Fig. 5C](#) zeigen einen Vergleich der antimykobakteriellen Wirksamkeit von freiem Rifampicin verglichen mit äquivalenten Dosen, die von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen abgegeben werden gemäß dem Verfahren von Beispiel 1.

[0017] [Fig. 6](#) zeigt die in-vitro-Freisetzungseigenschaften der mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchenformulierungen 2 bis 7 von Beispiel 2 über einen Zeitraum von 15 Tagen in Aufnahme Flüssigkeit.

[0018] [Fig. 7A](#), [Fig. 7B](#) und [Fig. 7C](#) sind Rasterelektronenmikrografien der Formulierung 7 mit großen mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen aus Beispiel 2. [Fig. 7C](#) zeigt den Querschnitt eines einzelnen Mikrokügelchens. Die Querbalken zeigen 100, 1,0 bzw. 10,0 µm.

[0019] [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) zeigen die Größenverteilung der mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchenformulierungen 6 und 7 aus Beispiel 2, bestimmt mit einem Malvern-Teilchengrößenanalysegerät.

[0020] [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) zeigen einen Vergleich von Mausekörpergewichten nach Injektion von kleinen bzw. großen Mikrokügelchen.

[0021] [Fig. 10](#) zeigt Rifampicin-Freisetzungseigenschaften bei Mäusen, denen kleine und große mit Rifampicin beladene Mikrokügelchen injiziert wurden, verglichen mit Mäusen, die tägliche Verabreichungen von freiem Rifampicin erhielten.

[0022] [Fig. 11A](#) bis [Fig. 11C](#) zeigen die Wirksamkeit von mit Aconiazid beladenen Mikrokügelchen bei der Verminderung des intrazellulären Wachstums von *M. tuberculosis* H37Ra in einer Mäuse-3774-Makrophagenzelllinie. Aconiazid (A) und Isoniazid (INH) (B)-Konzentrationen von freiem Wirkstoff waren 0 (0), 0,03 µg/ml (■), 0,1 µg/ml (▲) und 0,3 µg/ml (•). Die Aconiazidkonzentrationen von mit Wirkstoff beladenen Mikrokügelchen (c) entsprachen 0,03 µg/ml (■), 0,1 µg/ml (▲) und 0,3 µg/ml (•).

Definition und Verwendung von Ausdrücken

[0023] In dieser Beschreibung und in den Ansprüchen, die folgen, wird auf einer Anzahl von Ausdrücken Bezug genommen, die so definiert sein sollen, dass sie die folgenden Bedeutungen haben:

Die Singularformen "ein", "eine", "einer" und "der", "die", "das" in der Beschreibung und den beigefügten Ansprüchen schließen Pluralformen mit ein, wenn nicht der Zusammenhang eindeutig dagegen spricht. So schließt z.B. die Bezugnahme auf "ein Mikrokügelchen" Mischungen von Mikrokügelchen ein, die Bezugnahme auf "eine Dosierungsform" schließt Mischungen von zwei oder mehr Dosierungsformen ein und dgl.

[0024] Bereiche werden oft ausgedrückt als von "etwa" einem speziellen Wert und/oder bis "etwa" einem weiteren speziellen Wert. Wenn ein solcher Bereich ausgedrückt wird, schließt eine weitere Ausführungsform den Bereich von dem einen speziellen Wert und/oder bis zu dem anderen speziellen Wert ein. In gleicher Weise werden Werte, wenn sie als Annäherungen ausgedrückt sind, durch die Verwendung des vorgestellten Worts "etwa", so verstanden, dass der spezielle Wert eine weitere Ausführungsform bildet.

[0025] "Fakultativ" oder "gegebenenfalls" bedeutet, dass das nachfolgend beschriebene Ereignis oder der nachfolgend beschriebene Umstand auftreten kann oder nicht und dass die Beschreibung Fälle einschließt, bei denen dieses Ereignis oder dieser Umstand auftritt und Fälle, wo dies nicht so ist. Z.B. bedeutet der Ausdruck "gegebenenfalls modifiziertes Poly(lactid-co-glycolid)", dass das Polymer mit weiteren sauren Resten modifiziert sein kann und dass die Beschreibung sowohl modifiziertes als auch unmodifiziertes Poly(lactid-co-glycolid)polymer einschließt.

[0026] Unter dem Ausdruck "wirksame Menge" einer Verbindung (z.B. Wirkstoff) oder einer Eigenschaft, wie hier angegeben, wird eine solche Menge verstanden, die die Funktion der Verbindung oder die Eigenschaft liefern kann, für die eine wirksame Menge ausgedrückt wird. Außerdem bedeutet "wirksame Rate", wie es hier verwendet wird, die Verabreichungsrate der Verbindung (z.B. Wirkstoff) oder Zusammensetzung der Erfindung, die dazu führt, dass die gewünschte Wirkung (z.B. Behandlung oder Verhütung einer Infektion) erreicht wird. Die genaue Menge, die erforderlich ist, und die Verabreichungsrate variieren von Prozess zu Prozess abhängig von anerkannten Variablen, wie den angewendeten Verbindungen und den beobachteten Verfahrensbedingungen, wie hier ausgeführt. So ist es nicht möglich, eine exakte wirksame Menge oder effektive oder wirksame Rate anzugeben. Eine geeignete wirksame Menge und wirksame Rate kann jedoch von einem Fachmann auf diesem Gebiet unter Verwendung von Routineversuchen bestimmt werden.

[0027] Unter "pharmazeutisch annehmbar" wird ein Material verstanden, das nicht biologisch oder in sonstiger Weise unerwünscht ist, d.h., das Material kann an einen einzelnen zusammen mit der ausgewählten Verbindung oder dem Wirkstoff der Erfindung verabreicht werden, ohne irgendwelche unannehmbaren biologischen Wirkungen zu verursachen oder in einer unannehmbaren schädlichen Art und Weise mit irgendeiner der anderen Komponenten der pharmazeutischen Zusammensetzung, in der sie enthalten ist, eine Wechselwirkung zu ergeben.

[0028] Der Ausdruck biokompatibel wird definiert als ein Material, das für den Körper nicht toxisch ist, nicht karzinogen ist und in Körpergeweben keine Entzündung induzieren sollte. Es ist bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen biologisch abbaubar sind in dem Sinn, dass sie biokompatibel sind und dass sie durch Körperprozesse abgebaut werden sollten zu Produkten, die leicht vom Körper ausgetragen werden können und sich nicht im Körper ansammeln.

[0029] "Tuberkulose" oder "TB" bezieht sich auf eine Infektion oder Krankheit, bei der das verursachende Prinzip oder Mittel ein Mitglied des Tuberkulosekomplexes ist, wie *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* und *M. africanum*. "Tuberkulose" bezieht sich bevorzugt auf eine Infektion oder Krankheit, bei der das verursachende Prinzip oder Mittel *Mycobacterium tuberculosis* ist.

[0030] Der Ausdruck "Mikrokügelchen" soll nicht beschränkend verstanden werden und schließt jedes eine Verbindung tragende (z.B. Wirkstoff tragende) teilchenförmige oder körnige Material innerhalb des angegebenen speziellen Größenbereichs ein. Mikrokügelchen sind gewöhnlich Pulver, die aus Teilchen mit einem Durchmesser von 2 mm oder weniger, üblicher einem Durchmesser von 500 µm oder weniger bestehen. Der Ausdruck "Mikrokügelchen" schließt auch Teilchen und Material mit weniger als 1 µm ein, obwohl diese Teilchen oft als Nanokügelchen bezeichnet werden. Der Ausdruck "Mikrokügelchen", wie er in dieser Beschreibung verwendet wird, schließt übliche Mikrokügelchen (in denen der Wirkstoff über eine Trägermatrix verteilt enthalten ist), Mikrokapseln (in denen der Arzneiträger eine Haut oder Schale bildet, die den Wirkstoff umschließt und enthält) und Mikroteilchen ein, das als allgemeiner Ausdruck für irgendwelche Teilchen im angegebenen Größenbereich verwendet wird, ob kugelförmig oder nicht, da diese Ausdrücke typischerweise im Stand der Technik verwendet werden.

[0031] Gemäß einem Aspekt liefert die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Zusammensetzung zur Behandlung oder Verhütung einer intrazellulären Infektion bei einem Wesen, das eine solche Behandlung oder Verhütung benötigt, die eine erste wirksame Menge eines ersten geeigneten Wirkstoffs, der in ersten biokompatiblen Mikrokügelchen enthalten ist, die einen Durchmesser von etwa 1 bis etwa 10 µm haben (manchmal "kleine Mikrokügelchen"), wobei die ersten Mikrokügelchen den geeigneten Wirkstoff bei Verabreichung in einer ersten wirksamen Rate freisetzen, enthält. Das Verfahren findet spezielle Anwendung, um intrazelluläre Infektionen zu behandeln, die in Makrophagen und anderen phagozytischen Zellen, wie Kupfferzellen, Monozyten und Neutrophilen auftreten. In einer speziellen Ausführungsform haben die ersten biokompatiblen Mikrokügelchen einen Durchmesser von 1 bis 5 µm. In einer weiteren speziellen Ausführungsform haben die ersten biokompatiblen Mikrokügelchen einen Durchmesser von 5 bis 10 µm. In einer weiteren Ausführungsform haben die ersten biokompatiblen Mikrokügelchen einen Durchmesser von ≤ 10 µm. In weiteren Ausführungsformen haben die Mikrokügelchen einen Durchmesser im Bereich von 1 bis 10 µm, aber insbesondere größer als 2, 3, 4, 5 oder 6 µm und/oder kleiner als 9, 8, 7, 6, 5 oder 4 µm. Alle Mikrokügelchen in einem Bereich von 1 bis 10 µm sind in dem Ausdruck "kleine Mikrokügelchen", so wie dieser Ausdruck hier verwendet wird, enthalten.

[0032] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Methoden können verwendet werden, um eine Infektion durch ein fakultatives oder obligates intrazelluläres prokaryotisches Pathogen (z.B. pathogene Bakterien, Rickettsien und Chlamydien) zu behandeln. Z.B. können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Methoden verwendet werden, um intrazelluläre Infektionen zu behandeln, die durch Organismen verursacht werden, wie Rickettsien (z.B. Mitglieder der Fleckfiebergruppe [Zeckentyphus], *Rickettsia typhi*), *Coxiella burnetti* (z.B. verursachendes Prinzip von Q-Fieber), *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Legionella*-Arten (z.B. verursachendes Prinzip von Legionellose), *Brucella*-Arten (z.B. verursachendes Prinzip von Brucellose, *Brucella melitensis*), *Salmonella*-Arten (z.B. *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritis*), *Yersinia*-Arten (z.B. verursachendes Prinzip von Yersiniosis enteritis), *Mycoplasma*-Arten (z.B. *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*), *Bacillus*-Arten (z.B. verursachende Prinzipien von *Bacillus angiomatosis*), *Anaplasma*-Arten, *Borrelia*-Arten (z.B. *Borrelia burgdorferi*), *Treponema pallidum* und *Barfonella*-Arten (z.B. verursachendes Prinzip von *Baronella endocarditis*, *Baronella bacilliformis*), ohne darauf beschränkt zu sein.

[0033] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verwendet, um fakultative mykobakterielle Infektionen zu behandeln, was insbesondere z.B. Tuberkulose einschließt (insbesondere eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*) und eine Infektion mit *Mycobacterium avium*.

[0034] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können verwendet werden, um irgendein Tier oder Wesen, bei dem intrazelluläre Infektionen auftreten können, einschließlich Begleittiere bzw. Haustiere, wie Hunde-, Katzen- und Pferdearten, und Lebensmittel erzeugende Tiere, wie Rinder-, Schaf-, Schweine- und Vogelarten ebenso wie andere ökonomisch wichtige Tiere (z.B. Nerz, Chinchilla, Fuchs), die für eine intrazelluläre Infektion empfänglich sind, zu behandeln. Bevorzugt werden die Mikrokügelchen der Erfindung verwendet, um Menschen zu behandeln. Die Methoden sind auch besonders geeignet, um Patienten zu behandeln, bei denen das Immunsystem beeinträchtigt ist, einschließlich menschlicher Patienten, bei denen das erworbene Immunschwäche-syndrom (AIDS) aufgrund einer Infektion mit Humanimmunschwächevirus (HIV) diagnostiziert wurde.

[0035] Weiterhin können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen mit irgendeinem Wirkstoff, der zur Behandlung von intrazellulären Infektionen verwendet wird, verwendet werden. Beispiele für Wirkstoffe, die mit der erfindungsgemäßen Methode verabreicht werden können, schließen Tetracycline (z.B. Doxycyclin), Roxithromycin, Clarithromycin, Ofloxacin, Josamycin, Chloramphenicol, Rifampicin (Rifampin), Cotrimoxazol (Trimethoprim/Sulfamethoxazol), Erythromycin, Azithromycin, Amoxicillin, Streptomycin, Ciprofloxacin, Ceftriaxon, Gentamicin, Clindamycinoclofazimin, Amikacin, Sparfloxacin und Pristinamycin, ebenso wie andere Wirkstoffe oder Immunmodulatoren, die jetzt bekannt sind oder von denen später festgestellt wird, dass sie bei der Behandlung von intrazellulären Infektionen wirksam sind, ein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0036] Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist besonders gut dafür geeignet, Tuberkulose zu behandeln und jeder Wirkstoff, der Tuberkulose behandeln kann, kann mit der erfindungsgemäßen Methode verabreicht werden. Z.B. können Wirkstoffe zur Behandlung von Tuberkulose mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die Rifamycine (z.B. Rifampicin, Rifabutin), Macrolide, Chinoline und jede Kombination davon einschließen, ohne darauf beschränkt zu sein, wobei Rifamycine bevorzugter sind und Rifampicin oder Rifabutin die am

meisten bevorzugten Rifamycine sind.

[0037] Bei den meisten bekannten Behandlungsprinzipien wird Tuberkulose mit zwei oder mehr Wirkstoffen behandelt. Die vorliegende Erfindung kann auch verwendet werden, um mehrere Wirkstoffe zu verabreichen. Eine Kombination von einem oder mehreren mikroverkapselten Wirkstoffen und einem oder mehreren der gleichen oder verschiedenen nicht verkapselten Wirkstoffen könnte verabreicht werden. Weiterhin kann eine Kombination verschiedener mikroverkapselter Wirkstoffe verabreicht werden, in den gleichen oder in verschiedenen Mikrokügelchen und in jeder Kombination von großen und/oder kleinen Mikrokügelchen.

[0038] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind auch gut geeignet, um eine intrazelluläre Infektion zu behandeln, die durch *Mycobacterium avium* verursacht wird, und jeder Wirkstoff, der verwendet wird, um *Mycobacterium-avium*-Infektion zu behandeln, kann *Mycobacterium-avium*-Infektion mit den Methoden und den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung behandeln. Bevorzugte Wirkstoffe zur Behandlung von *Mycobacterium-avium*-Infektion schließen die Rifamycine (z.B. Rifampicin, Rifabutin), Clofazimin, Ciprofloxacin, parenterales Amikacin, Sparfloxacin und jede Kombination davon, ein, wobei Rifabutin am meisten bevorzugt ist.

[0039] Die Zusammensetzung enthält weiterhin eine zweite wirksame Menge eines zweiten geeigneten Wirkstoffs, der in zweiten biokompatiblen Mikrokügelchen enthalten ist, die einen Durchmesser von mehr als etwa 10 µm haben (manchmal "große Mikrokügelchen"), wobei die zweiten Mikrokügelchen den geeigneten Wirkstoff in einer zweiten wirksamen Rate freisetzen. Der zweite geeignete Wirkstoff kann, muss aber nicht notwendigerweise der gleiche sein, wie der erste geeignete Wirkstoff. Außerdem können kleine und/oder große Mikrokügelchen ein zweites und weitere Male verabreicht werden. Die großen Mikrokügelchen überschreiten üblicherweise nicht einen Durchmesser von 500 µm und bevorzugter überschreiten sie nicht einen Durchmesser von 150 µm.

[0040] Die ersten und zweiten Mikrokügelchen können zur gleichen Zeit oder zu verschiedenen Zeiten am gleichen Ort oder an verschiedenen Orten im Körper verabreicht werden. Außerdem kann ein freier Wirkstoff gemäß einem Behandlungsprotokoll für die Verabreichung des freien Wirkstoffs verabreicht werden, wie es im Stand der Technik wohl bekannt ist, zusammen mit den Mikrokügelchen, um die Behandlung zu ergänzen. So wird in einer weiteren Ausführungsform nicht verkapselter Wirkstoff dem Wesen oder Tier zusätzlich zu den kleinen Mikrokügelchen verabreicht. In einer noch weiteren Ausführungsform wird nicht verkapselter Wirkstoff dem Wesen oder Tier zusätzlich zu den großen und den kleinen Mikrokügelchen verabreicht.

[0041] Die kleinen Mikrokügelchen können mit jeder Methode verabreicht werden, die allgemein bekannt ist, um Wirkstoff an eine Zelle abzugeben (z.B. Makrophagen). Die großen Mikrokügelchen können mit jeder Methode verabreicht werden, die bekannt ist, um Wirkstoff aus den großen Mikrokügelchen in den Blutstrom abzugeben. Die kleinen Mikrokügelchen werden intravenös verabreicht und die großen Mikrokügelchen werden subcutan oder intramuskulär verabreicht. Nicht verkapselter Wirkstoff wird bevorzugt oral verabreicht. Die Zusammensetzungen enthalten eine wirksame Menge des ausgewählten Wirkstoffs und können in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger verabreicht werden und zusätzlich weitere medizinische Mittel, pharmazeutische Mittel, Träger, Hilfsstoffe, Verdünnungsmittel etc. enthalten. In einigen Fällen, z.B. bei fortgeschrittenen Stadien intrazellulärer Infektionen kann es vorteilhaft sein, einen oder mehrere Wirkstoffe in den Mikrokügelchen zusammen zu verkapseln.

[0042] In den meisten Fällen wird die Therapie gestartet unter Verwendung von zwei Injektionswegen, intravenös (kleine Mikrokügelchen) und subcutan (große Mikrokügelchen). Als ein Beispiel können kleine und große Mikrokügelchen am Tag 1 injiziert werden gefolgt von einer Injektion mit zweiten kleinen Mikrokügelchen am Tag 7. Konzentrationen eines Wirkstoffs in der Injektion hängen ab von dem jeweiligen Wirkstoff und der Menge an Wirkstoff, die notwendig ist, um die Blut- und Urinpegel zu erreichen, die der minimalen Hemmkonzentration (MIC) entsprechen oder größer sind. Da dies unter pathogenen Arten variiert, ist es nicht möglich, eine genaue Konzentration anzugeben. Eine genaue Konzentration kann auch nicht angegeben werden, da eine Injektion von mikroverkapseltem Wirkstoff zusammen mit anderen antibakteriellen Wirkstoffen gegeben werden kann, entweder mikroverkapselt oder nicht verkapselt. Ein Fachmann kann jedoch leicht jede übliche Behandlungstherapie in eine auf Mikrokügelchen basierende Therapie der vorliegenden Erfindung umwandeln, ohne übermäßige Versuche, z.B. unter Verwendung der im Stand der Technik gegebenen Lehren, wie solchen, die in Remington's Pharmaceutical Sciences gegeben werden.

[0043] Die Menge an verabreichter aktiver Verbindung und die relativen Mengen, die in großen Mikrokügelchen, kleinen Mikrokügelchen und nicht verkapselten Formen verabreicht werden, hängen natürlich ab von der

jeweiligen zu behandelnden oder zu verhütenden Krankheit, der jeweils verabreichten Verbindung oder dem jeweils verabreichten Wirkstoff, der Verabreichungsart, der Art des zu behandelnden Patienten, der Schwere der Krankheit, dem Gesamtzustand des Patienten, dem Gewicht des Patienten und der Beurteilung des verschreibenden Arztes. Es wird davon ausgegangen, dass die Gesamtdosis an verabreichter aktiver Verbindung bei dem Behandlungsplan bzw. Behandlungssystem der Erfindung nicht mehr als und im Allgemeinen erheblich weniger als die Menge an aktiver Verbindung ist, die bei üblichen Behandlungen verabreicht wird. Das Erfordernis von geringeren Dosen beruht auf der zielführenden Wirkung bei der Abgabe der aktiven Verbindung direkt an die betroffenen Zellen und als Weiteres der Fähigkeit der Mikrokügelchen, die aktive Verbindung über einen längeren Zeitraum freizusetzen, was die aktive Verbindung vor einem enzymatischen Abbau schützt, bis sie entweder innerhalb der Zelle oder im Blutstrom freigesetzt wird. Die Kombination dieser Merkmale der Erfindung führt zu dem Potenzial, äquivalente oder bessere biologische Wirkungen mit geringeren Dosen aktiver Verbindungen zu erreichen.

[0044] Als ein Beispiel kann insgesamt eine monatliche Dosierung zwischen etwa 1 mg/kg und 2.000 mg/kg Körpergewicht einer erfindungsgemäßen Verbindung, bevorzugt 100 mg/kg bis 1.000 mg/kg verkapselt in den Mikrokügelchen der Erfindung an einen Patienten verabreicht werden, für den die Verabreichung der Verbindung indiziert ist, wie hier angegeben, um eine intrazelluläre Infektion der Erfindung zu behandeln oder zu verhüten. Die Dosierung kann in jedem Anteil auf kleine Mikrokügelchen und große Mikrokügelchen der Erfindung aufgeteilt werden und auf einer Kombination von Wegen verabreicht werden (z.B. intravenöse Verabreichung einer ausreichenden Menge kleiner Mikrokügelchen bei einer oder mehreren Verabreichungen, um 500 mg/kg Verbindung bereitzustellen, und subcutane Verabreichung bei einer oder mehreren Verabreichungen einer ausreichenden Menge großer Mikrokügelchen, um 500 mg/kg der Verbindung bereitzustellen). Die verbindungshaltigen Mikrokügelchen der Erfindung können einmal täglich oder mehr als einmal täglich verabreicht werden. Die Mikrokügelchen können auch wöchentlich oder monatlich verabreicht werden und können über eine unbegrenzte Anzahl von Tagen, Wochen oder Monaten verabreicht werden, bis bestimmt ist, dass eine weitere Verabreichung nicht notwendig ist. Eine solche Bestimmung kann durch einen Fachmann auf diesem Gebiet erfolgen, indem Zeichen und Symptome und andere klinische Parameter, die mit der Diagnose einer intrazellulären Infektion bei dem Patienten verbunden sind, bei dem Patienten überwacht werden. Wenn bestimmt wird, dass die intrazelluläre Infektion nicht ausreichend behandelt wurde, wiedergekehrt ist oder dass wahrscheinlich ist, dass sie wiederkehrt, kann die Verabreichung der Mikrokügelchen der Erfindung wieder aufgenommen werden. Dieser beispielhafte Behandlungsplan ist insbesondere anwendbar für die Behandlung von Tuberkulose mit Rifampin.

[0045] Ein weiterer Nutzen der Erfindung besteht darin, dass jegliche toxische Nebenwirkungen aufgrund geringerer Dosiserfordernisse reduziert werden können. So liefert gemäß einem weiteren Aspekt die Erfindung eine Methode, um die Toxizität eines Wirkstoffs, der zur Behandlung von intrazellulären Infektionen verwendet wird, zu reduzieren, was beinhaltet, dass eine erste wirksame Menge eines geeigneten Wirkstoffs in ersten biokompatiblen Mikrokügelchen verkapselt wird, die einen Durchmesser von etwa 1 bis etwa 10 µm haben, wobei die ersten Mikrokügelchen den geeigneten Wirkstoff bei Verabreichung in einer ersten wirksamen Rate freisetzen.

[0046] Die Wirksamkeit der Verabreichung einer speziellen Dosis eines Wirkstoffs bei der Behandlung von intrazellulären Infektionen bei einem Patienten, bei dem diagnostiziert wurde, dass er eine Krankheit hat, die mit einer intrazellulären Infektion verbunden ist, kann mit Standardmethoden der Auswertung bestimmter Zeichen, Symptome und objektiven Labortests für eine spezielle Krankheit bestimmt werden, wie es im Stand der Technik bekannt ist. Diese Zeichen, Symptome und objektiven Labortests variieren abhängig von der jeweiligen zu behandelnden oder zu verhütenden Krankheit, wie es jedem Kliniker auf diesem Gebiet bekannt ist. Wenn 1) gezeigt wird, dass die Häufigkeit oder Schwere der Rückfälle bei einem Patienten verbessert wird, 2) gezeigt wird, dass das Fortschreiten der Krankheit stabilisiert wird oder 3) der Bedarf zur Verwendung weiterer Wirkstoffe reduziert wird, auf Basis eines Vergleichs mit einer geeigneten Kontrollgruppe und der Kenntnis über das normale Fortschreiten der Krankheit in der allgemeinen Bevölkerung oder der jeweiligen Einzelperson, dann wird die jeweilige Behandlung als wirksam angesehen.

[0047] Außerdem kann die Wirksamkeit der Verabreichung einer speziellen Dosis eines Wirkstoffs, um eine intrazelluläre Infektion bei einem Patienten zu verhüten, bei dem nicht bekannt ist, dass er eine Krankheit hat, die mit einer intrazellulären Infektion verbunden ist, von dem aber bekannt ist, dass er das Risiko hat, eine Krankheit zu entwickeln, die mit einer intrazellulären Infektion verbunden ist, bestimmt werden, indem über längere Zeit Standardzeichen, Symptome und objektive Labortests ausgewertet werden, wie es dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt ist. Dieses Zeitintervall kann groß oder klein sein abhängig von der jeweils betroffenen Krankheit. Die Bestimmung, wer ein Risiko zur Entwicklung einer Krankheit wie Tuberkulose hat, erfolgt

basierend auf dem derzeitigen Wissen der bekannten Risikofaktoren für eine spezielle Krankheit, wie es dem Arzt auf diesem Gebiet bekannt ist, z.B. bei Kontakt mit Personen, von denen bekannt ist, dass sie mit der Krankheit infiziert sind.

[0048] Sobald festgestellt ist, dass die Krankheitsaktivität signifikant durch eine spezielle Behandlung verbessert oder stabilisiert ist, werden spezifische Zeichen, Symptome und Labortests verfolgt zusammen mit einem verminderten oder abgesetzten Behandlungsverlauf. Wenn die Krankheitsaktivität wiederkehrt, basierend auf Standardmethoden der Auswertung spezieller Zeichen, Symptome und objektiver Labortests für eine spezielle Krankheit, kann die Behandlung wieder aufgenommen werden.

[0049] Die vorliegende Erfindung ist besonders geeignet für die Behandlung von mit TB infizierten Patienten, ob sie die Krankheit entwickelt haben oder nicht. Die meisten Personen, die mit TB infiziert sind, entwickeln die Krankheit nicht (~ 90 bis 95%). Infizierte Personen können durch einen TB-Hauttest und eine Röntgenuntersuchung diagnostiziert werden. Der Hauttest ist die definitive Feststellung, wenn bestimmt wird, ob ein Patient infiziert ist, aber eine gute Krankheitsgeschichte ist auch sehr hilfreich. Um zu bestimmen, ob ein Patient die Krankheit hat, muss das Sputum des Patienten kultiviert werden. Die definitive Diagnose der Krankheit ist die Kultur und Identifizierung des Organismus. Dies kann 3 bis 5 Wochen dauern. Allgemein entwickeln 5 bis 10% der infizierten Personen die Krankheit, die sich, wenn sie unbehandelt bleibt, schließlich im ganzen Körper verteilen kann. Der Zeitraum für das Fortschreiten kann variieren. Faktoren, die dazu beitragen, sind Gesundheitszustand, Ernährung und Immunstatus des Einzelnen. Bei AIDS-Patienten wäre das Fortschreiten bis zum Tod viel schneller, da ihr Immunstatus durch HIV stark eingeschränkt ist.

[0050] Wenn TB diagnostiziert wird, wird der Patient auf eine Wirkstofftherapie gesetzt, die 6 bis 12 Monate dauern kann und typischerweise aus zwei bis drei unterschiedlichen Wirkstoffen besteht. Wirkstofftherapien unter Verwendung nicht verkapselter Wirkstoffe können variieren und werden typischerweise von Jahr zu Jahr revidiert. Bei Therapien mit nicht verkapseltem Wirkstoff wird eine Person mit einem aktiven Fall von TB allgemein mit mehr als einem Wirkstoff behandelt, wie z.B. denen, die in den Tabellen A, B und C gezeigt sind, die von Friedman, Tuberculosis: Current Concepts and Treatment (1994, CRC Press) erhältlich sind. Tuberkulosebehandlungspläne unter Verwendung nicht verkapselter Wirkstoffe sind allgemein bei Friedman, Tuberculosis: Current Concepts and Treatment (1994, CRC Press) angegeben.

[0051] Behandlungspläne für die Verabreichung beim Menschen können auch im Zusammenhang mit Tierstudien entwickelt werden. Diese Tierstudien können als Modelle verwendet werden, um die geeigneten Dosierungsraten für Menschen zu finden (z.B. in mg/kg Körpergewicht) basierend auf dem Vergleichsgewicht von Menschen und Tieren, die getestet werden. (B. Ji et al., 1993, Am. Rev. Respir. Dis. 148:1541-1546).

Tabelle A: Dosisempfehlung für die Anfangsbehandlung von Tuberkulose bei Kindern^a und Erwachsenen^b

Wirkstoffe	Dosierung					
	Tägl. Dosis		Dosis 2 x wöchentlich		Dosis 3 x wöchentlich	
	Kinder	Erwach-sene	Kinder	Erwachsene	Kinder	Erwachsene
Isoniazid (mg/kg)	10-20	5	20-40	15	20-40	15
Maximum (mg)	300	300	900	900	900	900
Rifampin (mg/kg)	10-20	10	10-20	10	10-20	10
Maximum (mg)	600	600	600	600	600	600
Pyrazinamid (mg/kg)	15-30	15-30	50-70	50-70	50-70	50-70
Maximum (g)	2	2	4	4	3	3
Ethambutol ^c (mg/kg)	15-25	15-25	50	50	25-30	25-30
Streptomycin (mg/kg)	20-40	15	25-30	25-30	25-30	25-30
Maximum (g)	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5

^aKinder ≤ 12 Jahre alt^bVon American Thoracic Society/Centers for Disease Control^cEthambutol wird allgemein für Kinder nicht empfohlen, deren Sehschärfe nicht überwacht werden kann (< 8 Jahre alt). Ethambutol sollte jedoch für alle Kinder in Betracht gezogen werden mit Organismen, die gegenüber anderen Wirkstoffen resistent sind, wenn Empfindlichkeit gegenüber Ethambutol gezeigt wurde oder eine Empfindlichkeit wahrscheinlich ist.

Tabelle B: Zweitrangige Antituberkulosewirkstoffe^{a,b}

Wirkstoff	Dosierungsformen	Tägl. Dosis bei Kindern und Erwachsenen ^c (mg/kg)	Maximale tägl. Dosis bei Kindern und Erwachsenen (g)	Hauptnebenwirkungen	Empfohlene regelmäßige Überwachung
Capreomycin	Gläschen: 1 g	15 bis 30 im	1	Gehör, Vestibulum und Nierentoxizität	Vestibulumfunktion, Audiometrie, Blutharnstoffstickstoff und Kreatinin
Kanamycin	Gläschen: 75 mg, 500 mg, 1 g	15 bis 30 im	1	Gehör und Nierentoxizität, selten Vestibulumtoxizität	Vestibulumfunktion, Audiometrie, Blutharnstoffstickstoff und Kreatinin
Ethionamid	Tabletten: 250 mg	15-20 p.o.	1	Gastrointestinale Störungen, Hepatotoxizität, Überempfindlichkeit	Leberenzyme
p-Aminosalicylsäure	Tabletten: 500 mg, 1 g Körnchen mit verzögerter Freisetzung, Pulver	150 p.o.	12	Gastrointestinale Störungen, Hepatotoxizität, Überempfindlichkeit, Natriumbelastung	Leberenzyme
Cycloserin	Kapseln: 250 mg	15 bis 20 p.o.	1	Psychose, Krämpfe, Ausschlag	Feststellung des mentalen Status

^aVon American Thoracic Society/Centers for Disease Control^bDiese Wirkstoffe sind schwieriger zu verwenden, als die in Tabelle A aufgeführten Wirkstoffe. Sie sollten nur verwendet werden, falls notwendig und sollten von einem Gesundheitsdienst, der in ihrer Verwendung erfahren ist, verschrieben und überwacht werden.^cDosen basierend auf dem Gewicht sollten als Gewichtsänderungen eingestellt werden.

Tabelle C: Derzeitige Empfehlungen für eine Therapie einer akuten oder wahrscheinlich wirkstoffsensitiven Tuberkulose(Übernommen von American Thoracic Society/Centers for Disease Control.)-6-Monatstherapie

Option 1

[0052] Acht Wochen täglich Isoniazid, Rifampin und Pyrazinamid, anschließend 16 Wochen Isoniazid und Rifampin, täglich oder zwei- bis dreimal pro Woche. In Gegenden, in denen nicht dokumentiert ist, dass die Isoniazidresistenz kleiner als 4% ist, sollte Ethambutol oder Streptomycin dem anfänglichen Dosierungsschema zugefügt werden, bis eine Empfindlichkeit gegenüber Isoniazid und Rifampin gezeigt wird. Alle Dosierungs-

schemata, die zweimal oder dreimal wöchentlich verabreicht werden, sollten durch direkt beobachtete Therapie überwacht werden. Ein medizinischer Experte für Tuberkulose sollte beigezogen werden, wenn der Patient Symptome zeigt oder nach drei Monaten einen positiven Abstrich oder eine positive Kultur hat.

Option 2

[0053] Zwei Wochen täglich Isoniazid, Rifampin, Pyrazinamid und Streptomycin oder Ethambutol und anschließend 6 Wochen die gleichen Wirkstoffe, zweimal wöchentlich, verabreicht als direkt beobachtete Therapie, gefolgt von 16 Wochen Isoniazid und Rifampin, verabreicht zweimal wöchentlich, bei direkt beobachteter Therapie in Fällen, in denen gezeigt wird, dass der Organismus wirkstoffempfindlich ist. Ein medizinischer Experte für Tuberkulose sollte beigezogen werden, wenn der Patient Symptome zeigt oder wenn nach 3 Monaten ein Abstrich oder eine Kultur positiv ist.

Option 3

[0054] Dreimal wöchentlich Isoniazid, Rifampin, Pyrazinamid und Ethambutol oder Streptomycin über 6 Monate, verabreicht als direkt beobachtete Therapie. (Der stärkste Nachweis bei klinischen Versuchen zeigt die Wirksamkeit aller vier Wirkstoffe, wenn sie volle 6 Monate verabreicht werden). Es gibt schwächere Hinweise, dass Streptomycin nach 4 Monaten abgesetzt werden könnte, wenn das Isolat für alle Wirkstoffe empfindlich ist. Der Hinweis, Pyrazinamid vor dem Ende von 6 Monaten zu stoppen, ist gleich für den Dreifachwöchentlich-Dosierungsplan und es gibt keinen Hinweis für die Wirksamkeit des Dosierungsplans mit Ethambutol bei weniger als vollen 6 Monaten. Ein medizinischer Experte für Tuberkulose sollte beigezogen werden, wenn der Patient asymptomatisch ist oder Abstriche oder Kulturen nach 3 Monaten positiv sind.

Mit HIV in Beziehung stehende Tuberkulose

[0055] Option 1, 2 oder 3 unter einer 6-Monatstherapie kann verwendet werden, aber die Patienten sollten viel enger überwacht werden. Wenn es ein Problem gibt mit dem Ansprechen auf die Behandlung, sollte die übliche Bewertung ausgeführt werden und die Therapie verlängert werden.

9-Monatstherapie

[0056] Neun Monate täglich Isoniazid und Rifampin oder 1 bis 2 Monate täglich Isoniazid und Rifampin gefolgt von 7 bis 8 Monaten täglich oder zweimal wöchentlich Isoniazid und Rifampin für eine Therapie von insgesamt 9 Monaten. Eine direkt beobachtete Therapie sollte verwendet werden für die zweimal wöchentlich gegebene Verabreichung. Ethambutol oder Streptomycin sollten in den ersten zwei Monaten zugefügt werden in Gegenden, in denen nicht dokumentiert ist, dass die Isoniazidresistenz kleiner als 4% ist.

4-Monatstherapie

[0057] Behandlung wie bei den Optionen 1, 2 oder 3 unter der 6-Monatstherapie, abgekürzt auf 4 Monate bei Patienten, die kein hohes Risiko haben und Abstrich-negativ und Kultur-negativ auf Lungentuberkulose sind.

[0058] Patienten, die auf TB behandelt werden, werden im Allgemeinen jeden Monat überwacht, um ihr Ansprechen auf die Behandlung zu beobachten. Sputumkulturen werden genommen, bis sie negativ werden. Es wird empfohlen, dass dies jede Woche erfolgt. Patienten werden auch dazu ermuntert, ihre Therapie fortzusetzen, aber dies ist manchmal sehr schwierig, da sich die Patienten tatsächlich besser fühlen, wenn sie die Wirkstoffaufnahme beenden. Dies beruht auf einigen Nebenwirkungen, die von den Wirkstoffen erzeugt werden. Ärzte können auch klinische Parameter, wie Leberfunktionstests (d.h. Enzyme), Blutkörperchenzählung, Blutharnstoffstickstoff, Kreatinin etc. überwachen, um sicherzustellen, dass sich keine Toxizität auf die Wirkstoffe entwickelt hat. Wenn sich eine Toxizität entwickelt, kann der Dosierungsplan modifiziert werden. Die Therapie wird allgemein als erfolgreich angesehen, wenn beständig negative Sputumkulturen beobachtet werden. TB kann sich jedoch zu dem entwickeln, was als "latenter Zustand" oder "Ruhezustand" bezeichnet wird. Dies wird nicht vollständig verstanden, betrifft aber die Fähigkeit der Tuberkelbazillen, das Wachstum zu stoppen und über lange Zeiträume latent zu bleiben. In einigen Fällen kann eine Person diesen Zustand mehrere Jahre haben, sogar wenn sie oder er behandelt worden ist. Auch wenn die Kulturen des Patienten negativ sind, bleibt der Patient immer noch infiziert. Wenn die Person älter wird und ihr oder sein Immunsystem weniger effizient wird, kann er oder sie einen reaktivierten Fall von TB entwickeln.

[0059] Wenn eine Person nur Hauttest-positiv auf TB ist und keine Zeichen einer aktiven Erkrankung zeigt

(z.B. negatives Sputum), ist es möglich, ihn oder sie nur mit einem Wirkstoff (Chemoprophylaxe) zu behandeln. In diesem Fall kann Isoniazid verwendet werden. Wie in Tabelle D gezeigt, ist dies auch kompliziert und variiert abhängig von einer Vielzahl von Faktoren. Im Allgemeinen ist der Zeitrahmen 6 bis 12 Monate.

Tabelle D: Infektion und Behandlung^a

Verhärtung	Gruppen, bei denen angenommen wird, dass die Infektion vorhanden ist bei dem spezifischen Verhärtungsgrad	Behandlung ^b
< 5 mm	Erwachsene und Kinder, die in engem Kontakt sind	Behandeln bis 12 Wochen nach dem letzten Kontakt, wonach der Hauttest wiederholt wird
≥ 5 mm	Enge Kontakte HIV+ oder unbekannter Status bei Risiko, fibrotische Läsion im oberen Lappen	alle Altersgruppen 6 bis 12 Monate behandeln; alle Altersgruppen 12 Monate behandeln; alle Altersgruppen 12 Monate behandeln, wenn nicht vorher behandelt. 4 Monate Mehrfachwirkstoffchemotherapie ist auch annehmbar

(Fortsetzung von Tabelle D)

Verhärtung	Gruppen, bei denen angenommen wird, dass die Infektion vorhanden ist bei dem spezifischen Verhärtungsgrad	Behandlung ^b
≥ 10 mm	Silicose, hohes Risiko für andere, IVDA (HIV-negativ) und medizinisches Risiko	alle Altersgruppen für 12 Monate behandeln, wenn nicht vorher behandelt. 4 Monate Mehrfachwirkstoffchemotherapie ist auch annehmbar Alter < 35 6 bis 12 Monate behandeln; alle Altersgruppen 6 bis 12 Monate behandeln; alle Altersgruppen 6 bis 12 Monate behandeln (12 Monate bei Personen, deren Immunsystem beeinträchtigt ist)
≥ 15 mm ^c	Geringes Risiko	Alter < 35 6 bis 12 Monate behandeln
10 mm Anwachsen über einen Zeitraum von 2 Jahren für ein Alter < 35 oder Hauttestverhärtung ≥ 10 mm bei einer Person < 4 Jahre unabhängig von vorherigen Testergebnissen	Kürzlich umgewandelt	6 bis 12 Monate behandeln; 9 Monate behandeln bei Säuglingen und Kindern
15 mm Anwachsen über einen Zeitraum von 2 Jahren für ein Alter ≥ 35 ^c	Kürzlich umgewandelt	6 bis 12 Monate behandeln

^aAngepasst gemäß American Thoracic Society, Centers for disease Control und American Thoracic Society/Centers for Disease Control

^bIsoniacid 300 mg pro Tag oder 15 mg/kg bis zu 900 mg zweimal wöchentlich

^cder Grad der Verhärtung bzw. Induration, der als positives Ergebnis akzeptiert wird, kann modifiziert werden basierend auf regionalen Faktoren, wie dem Risiko von atypischen mycobakteriellen Infektionen und dem Risiko einer aktuellen Tuberkuloseinfektion. In Gegenden, wo das Risiko einer aktuellen Tuberkuloseinfektion das Risiko einer atypischen Infektion weit übersteigt, wie New York City, sollte der Verhärtungsgrad, der als positiv angenommen wird, 10 mm sein.

[0060] Pharmazeutisch verabreichbare Zusammensetzungen können mit mehreren Methoden hergestellt werden, was z.B. einschließt, dass aktive Mikrokügelchen, wie hier beschrieben, und gegebenenfalls pharmazeutische Adjuvanzen in einem Träger, wie z.B. Wasser, Kochsalzlösung, wässrige Dextrose, Glycerin, Ethanol und dgl. dispergiert werden, um eine Suspension zu bilden. Falls erwünscht, kann die pharmazeutische Zusammensetzung, die verabreicht werden soll, auch geringere Mengen nicht toxische Hilfssubstanzen enthalten, wie Benetzungs- oder Emulgiermittel, pH-Puffermittel und dgl., z.B. Natriumacetat, Sorbitanmonolaurat, Triethanolaminnatriumacetat, Triethanolaminoleat etc. Aktuelle Methoden, um solche Dosierungsformen herzustellen, sind bekannt oder ergeben sich für den Fachmann auf diesem Gebiet, wie z.B. in Remington's Pharmaceutical Sciences beschrieben.

[0061] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können leicht synthetisiert werden unter Verwendung von Techniken, die allgemein bekannt sind für die Formulierung von Mikrokügelchen und Mikroteilchen. Geeignete experimentelle Methoden, um Mikrokügelchen oder Mikroteilchen herzustellen, werden z.B. in U.S.-Patent Nr. 5 407 609 von Tice et al. und 5 654 008 von Herbert et al. beschrieben. Methoden zur Herstellung spezifischer und bevorzugter Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung werden im Detail in den Beispielen unten beschrieben.

[0062] Geeignete Materialien, mit denen die Mikrokapseln hergestellt werden, schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, ein: Poly(diene), wie Poly(butadien) und dgl.; Poly(alkene), wie Polyethylen, Polypropylen und dgl.; Poly(acryl), wie Poly(acrylsäure) und dgl.; Poly(methacryl), wie Poly(methylmethacrylat), Poly(hydroxyethylmethacrylat) und dgl.; Poly(vinylether); Poly(vinylalkohole); Poly(vinylketone); Poly(vinylhalogenide), wie Poly(vinylchlorid) und dgl.; Poly(vinylnitril); Poly(vinylester), wie Poly(vinylacetat) und dgl.; Poly(vinylpyridine), wie Poly(2-vinylpyridin), Poly(5-methyl-2-vinylpyridin) und dgl.; Poly(styrol); Poly(carbonate); Poly(ester); Poly(orthoester); Poly(esteramide); Poly(anhydride); Poly(urethane); Poly(amide); Poly(lactid); Poly(glycolid); Poly(caprolacton); Poly(hydroxybutyrat); Celluloseether, wie Methylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose und dgl.; Celluloseester, wie Celluloseacetat, Celluloseacetatphthalat, Celluloseacetatbutyrat und dgl.; Poly(saccharide); Proteine, Gelatine, Stärke, Gummen, Harze und dgl. Diese Materialien können allein verwendet werden, als physikalische Mischungen oder als Copolymere. Eine bevorzugte Gruppe von Materialien schließen biologisch abbaubare Polymere ein, was Poly(lactid-co-glycolid), Poly(lactid), Poly(lactid-co-caprolacton), Poly(caprolacton) und Poly(anhydrid) einschließt, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0063] Die Zusammensetzung ist gut geeignet zur Behandlung von Tuberkulose und einer Infektion mit *M. avium*.

[0064] Im Fall von Zusammensetzungen zur Behandlung von Tuberkulose ist der Wirkstoff bevorzugt Rifamycin, ein Macrolid, ein Chinolin oder eine Kombination davon und bevorzugter ist es ein Rifamycin, das am meisten bevorzugt Rifampicin oder Rifabutin ist. Die biokompatiblen Mikrokügelchen können auch einen pharmazeutischen Träger aufweisen, was für die intravenöse Verabreichung bevorzugt ist.

[0065] Die Erfindung stellt zweite große Mikrokügelchen, wie vorher diskutiert, zusätzlich zu den kleinen Mikrokügelchen bereit. Somit liefert gemäß einer weiteren Ausführungsform die Erfindung einen Kit zur Behandlung einer intrazellulären Infektion bei einem Patienten, der (a) eine wirksame Menge eines geeigneten Wirkstoffs, der in ersten biokompatiblen Mikrokügelchen enthalten ist (a/k/a kleine Mikrokügelchen), die den geeigneten Wirkstoff bei Verabreichung in einer ersten wirksamen Rate freisetzen und (b) eine wirksame Menge eines geeigneten Wirkstoffs, der in zweiten biokompatiblen Mikrokügelchen enthalten ist (a/k/a große Mikrokügelchen), die den geeigneten Wirkstoff bei Verabreichung in einer zweiten wirksamen Rate freisetzen, enthält, wobei die ersten Mikrokügelchen einen Durchmesser von etwa 1 bis etwa 10 µm haben und die zweiten Mikrokügelchen einen Durchmesser größer als etwa 10 µm haben und wobei der Wirkstoff für die ersten und zweiten Mikrokügelchen gleich oder verschieden sein kann.

[0066] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Kit bereitgestellt, um eine intrazelluläre Infektion bei einem Wesen oder Tier zu behandeln, der (a) eine wirksame Menge eines geeigneten Wirkstoffs enthalten in ersten biokompatiblen Mikrokügelchen, die den geeigneten Wirkstoff bei Verabreichung in einer ersten wirksamen Rate freisetzen, und (b) eine wirksame Menge eines geeigneten nicht verkapselten Wirkstoffs enthält, wobei die ersten Mikrokügelchen einen Durchmesser von etwa 1 bis etwa 10 µm haben und wobei der Wirkstoff für die ersten Mikrokügelchen und der verkapselte Wirkstoff gleich oder verschieden sein können.

[0067] Die großen Mikrokügelchen dieser Erfindung vermitteln bevorzugt eine kontinuierliche und verlängerte systemische Freisetzung des Wirkstoffs an den Patienten. Im Gegensatz dazu sind die kleinen Mikrokügelchen bevorzugt so aufgebaut, dass sie die Freisetzung des Wirkstoffs bis zur Aufnahme durch die Makrophagen verzögern.

Beispiele

[0068] Die folgenden Beispiele werden angegeben, um dem Fachmann eine vollständige Offenbarung und Beschreibung davon zu liefern, wie die Methoden und Verbindungen, die hier beansprucht werden, durchgeführt, hergestellt und ausgewertet werden und sind nur beispielhaft für die Erfindung und sollen den Schutzbereich dessen, was die Erfinder als ihre Erfindung ansehen, nicht beschränken. Es wurden Anstrengungen unternommen, um die Genauigkeit im Hinblick auf Zahlen sicherzustellen (z.B. Mengen, Temperatur etc.), aber

Fehler und Abweichungen können auftreten. Wenn nicht anders angegeben, sind Teile Gewichtsteile, die Temperatur ist in Grad Celsius (°C) oder ist Raumtemperatur und der Druck ist atmosphärischer Druck oder in etwa atmosphärischer Druck.

Beispiel 1: In-vitro-Studien

Herstellung von Rifampicin-Mikrokügelchen in kleiner Größe (1 bis 10 µm)

[0069] Kleine Mikrokügelchen wurden wie folgt hergestellt: Zuerst wurde eine Trägerlösung hergestellt, indem ungefähr 2,8 g Poly(DL-lactid-co-glycolid) (DL-PLG) entweder in 11,0 g Methylenchlorid oder 11,0 g Ethylacetat gelöst wurden. Zu dieser Trägerlösung wurden ungefähr 150 mg Rifampicin zugegeben und durch sorgfältiges Vermischen wurde eine homogene Lösung erhalten. Die entstehende Mischung wurde dann in 300 ml eines wässrigen Prozessmediums, das Poly(vinylalkohol) (PVA) (Air Products Inc., Allentown, PA) und Carboxymethylcellulose (CMC) (Air Products Inc., Allentown, PA) (2,0 Gew.-% PVA/0,5 Gew.-% CMC) enthielt, eingeleitet. Die Lösung wurde 20 ± 10 Sekunden mithilfe eines Silverson-Emulgators (Silverson Machines, East Longmeadow, MA) gerührt, was eine Emulsion lieferte, die aus Mikrotröpfchen geeigneter Größe bestand. Die Emulsion wurde dann sofort in 5,0 l Wasser überführt. Die entstehenden Mikrokügelchen wurden dann durch Zentrifugation eingeengt, gesammelt und lyophilisiert. Der Rifampicingehalt jeder Charge von Mikrokügelchen wurde bestimmt, indem das Rifampicin aus einer bekannten Menge von Mikrokügelchen extrahiert wurde und die Menge an Rifampicin spektrofotometrisch quantitativ bestimmt wurde.

Analyse der in-vitro-Freisetzung von Rifampicin-Mikrokügelchen

[0070] Um die Freisetzungskinetik von Rifampicin aus Mikrokügelchen festzustellen, wurden mehrere Proben jeder Mikrokügelchencharge in 16×100 mm-Glasteströhrchen, die mit Serumentrennern ausgestattet waren, eingewogen (Fisher Scientific). In jedes Röhrchen wurden 3,0 ml Aufnahme Flüssigkeit, die aus 0,05 M Natriumphosphatlösung bestand, gegeben. Die Teströhrchen wurden in einen Inkubator gestellt, der auf 37°C gehalten wurde. Die Aufnahme Flüssigkeit wurde entfernt und nach 2, 6, 24 Stunden und alle 24 bis 48 Stunden danach durch neue Flüssigkeit ersetzt. Die Menge an Rifampicin, die freigesetzt wurde, wurde mit einem Standard-HPLC-Assay bestimmt, wie in der US-Pharmakopöe beschrieben. Ein Absorptionsmaximum von 254 nm wurde verwendet.

Bestimmung der Größe der Mikrokügelchen und Sterilisierung

[0071] Die Größenverteilung für jede Charge von Rifampicin-Mikrokügelchen wurde bestimmt unter Verwendung eines Malvern Teilchengrößenanalysegeräts (Malvern Instruments, Malvern, UK). Die Mikrokügelchenchargen wurden mit Gammastrahlung (25 kGy Dosis) von Neutron Products Inc., Dickerson, MD, sterilisiert. Nach der Sterilisierung wurden die Mikrokügelchenformulierungen getrocknet bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Oberflächenmorphologie der Mikrokügelchenpräparate wurde mit Rasterelektronenmikroskopie (SEM) untersucht.

Mycobakterielle Stämme.

[0072] *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294, SRI#1345) wurde auf Middlebrook 7H10-Schrägauskulturen gehalten, die 0,5% Glycerin und 10% OADC (Difco) enthielten. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) für Rifampicin wurde von Etest mit 0,06 bis 0,25 µg/ml bestimmt.

Monozytenzelllinien

[0073] Die J774-Mausmakrophagenzelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC TIB 67; Rockville, MD) erhalten und in RPMI 1640-Medium, das mit 10% durch hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin ergänzt war, gehalten. Die Mono-Mac-6-Zelllinie (MM6) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland, erhalten. Die MM6-Zellen wurden in RPMI-1640, das 10% (V/V) fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, nicht essenzielle Aminosäuren, 1 mM Natriumbrenztraubensäure und 9 mg Rinderinsulin (Sigma Chem. Co, St. Louis, MO) pro ml enthielt, gehalten. Die Zelllinien wurden routinemäßig getestet, um die Abwesenheit von Mycoplasma kontamination sicherzustellen unter Verwendung des Gen-Probe Mycoplasma Rapid Detection Systems (Gen-Probe, San Diego, CA).

Behandlung von Monozyten mit Mikrokügelchen

[0074] Die J774- und MM6-Monozytenzelllinien wurden entweder mit Placebos (d.h. Mikrokügelchen ohne Wirkstoff, nur polymerer Träger) oder mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchenpräparaten behandelt unter Verwendung des unten beschriebenen Verfahrens. Bei einer Reihe von Versuchen wurden nicht infizierte Monozyten verwendet, um die Aufnahme von Mikrokügelchen und die Freisetzung von Rifampicin aus Mikrokügelchen zu erreichen. In einer anderen Reihe von Versuchen wurden mit *M. tuberculosis* H37Rv-infizierte Monozyten verwendet, um die intrazelluläre Wirksamkeit von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchenpräparaten zu untersuchen. In weiteren Versuchen wurden J774-Makrophagen mit Rifampicin beladene Mikrokügelchen 24 Stunden lang aufnehmen gelassen; die Menge an Wirkstoff, die während des Aufnahmezeitraums abgegeben wurde, wurde untersucht. Diese Information wurde dann verwendet, um die Wirksamkeit von Rifampicin, das in Mikrokügelchenpräparaten gegeben wurde, mit äquivalenten Konzentrationen des freien Wirkstoffs zu vergleichen, die verwendet wurden, um mit *M. tuberculosis* infizierte Makrophagen zu behandeln.

[0075] Mono-Mac-6-Zellen wurden auf 12-Napf-Gewebekulturplatten (Corning) mit einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml/Napf in MM6-Medium, das 1 % FBS enthielt, ausplattiert. Drei Platten für jedes Präparat wurden eingesetzt, um nach 2, 4 und 7 Tagen zu ernten. In neun Näpfe pro Platte wurden 40 µg rifampicinhaltige Mikrokügelchen gegeben; drei Näpfe pro Platte waren Kontrollen. Zur Zeit der Ernte wurde der Inhalt jedes Napfs in sterile Makrophagenröhrchen überführt und mit 10.000 g 4 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände aus jeweils drei Näpfen wurden entnommen und in ein steriles 12 × 100 mm Pyrexröhrchen überführt, eingefroren und lyophilisiert. Die mikroskopische Untersuchung von Überständen zeigte die Abwesenheit von Makrophagen oder Mikrokügelchen.

[0076] Die J774-Makrophagen wurden in Falcon-12-Napf-Gewebekulturplatten in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/Napf/ml plattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch 1,0 ml Medium/Napf ersetzt, das nur 1 % FBS enthielt. Versuchsnapfen wurden 40 µg Mikrokügelchen zugegeben. Die Proben wurden nach 2, 4 und 7 Tagen auf gleiche Weise, wie die MM6-Proben, geerntet. Für den biologischen Assay wurden lyophilisierte Proben wieder in 240 µl sterilem Wasser (Sigma) suspendiert und auf Eis gehalten. 80-µl-Proben aus jedem Pyrexröhrchen, die äquivalent dem Inhalt eines Napfs eines dreifachen Ansatzes waren, wurden auf Scheiben absorbiert und bezüglich der Wirkstoffaktivität ausgewertet unter Verwendung des unten beschriebenen biologischen Assays bzw. Tests.

Test der Lebensfähigkeit der Makrophagen

[0077] Die Zelllebensfähigkeit wurde untersucht mithilfe eines modifizierten MTT-(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid [Thiazolylblau])-Cytotoxizitätstests (Sigma).

Biologischer Assay

[0078] Ein biologischer Assay bzw. biologischer Test unter Verwendung von *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) wurde entwickelt, um Rifampicinkonzentrationen in Makrophagenkulturüberständen zu bestimmen. Vorratslösungen von Rifampicin in Methanol (Fisher) mit HPLC-Qualität wurden hergestellt, Aliquots gebildet und bei -70°C eingefroren. Für den Test wurden Standardlösungen von Rifampicin in dem geeigneten Gewebekulturmedium der Makrophagenzelllinie in doppeltem Ansatz hergestellt und untersucht mit Testproben, um eine Standardkonzentrationskurve zu erstellen.

[0079] Sterile Filterpapierscheiben (13 mm Durchmesser, Schleicher & Schüll) wurden aseptisch in einzeln bezeichnete Näpfe von 12-Napf-Gewebekulturplatten gelegt und jeweils 80 µl der Probe wurden auf der Scheibe absorbiert. Während der Herstellung wurden die Platten auf kalte Tablettis gelegt. Die Gewebekulturplatten, die imprägnierte Scheiben enthielten, wurden auf 4°C gekühlt, bis zu ihrer Anwendung auf Agarplatten. Unter Verwendung der direkten Koloniesuspensionsmethode (NCCLS, Dokument M2-A5, Bd. 13, #24, 1993) wurde eine Suspension von *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) hergestellt und so eingestellt, dass sie dem 0,5-McFarland-Trübheitsstandard entsprach. Innerhalb von 15 Minuten nach Herstellung der Suspension wurden 150 mm Mueller-Hinton-Agarplatten für das Wachstum des Rasens vorbereitet. Die vorher beladenen Scheiben mit Makrophagenkulturüberständen ebenso wie Standardwirkstoffkonzentrationen wurden aseptisch auf die geimpften Platten aufgelegt unter Verwendung von sterilen Pinzetten und vorsichtig gedrückt, um einen gleichmäßigen Kontakt mit dem Medium herzustellen. Die Platten wurden mit Parafilm versiegelt, umgedreht und 18 bis 20 Stunden lang in einen Inkubator mit 37°C (ohne CO₂) gestellt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zonen für Wirkstoffstandards gemessen und eine Standardkurve erstellt. Die Zonendurchmesser für Testproben wurden gemessen und die Werte in den Computer eingegeben für eine Regressionsanalyse, um

die Menge an Wirkstoff in 80 µl Makrophagenkulturüberstand zu bestimmen. Der Wert wurde in µg Wirkstoff/ml Makrophagenkulturüberstand umgewandelt.

Bestimmung des Rifampicingehalts in phagozytisierten Mikrokügelchen

[0080] J774-Makrophagen wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml/Napf plattiert und in einen CO₂-Inkubator bei 37°C gestellt. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert, wonach das Medium durch Medium ersetzt wurde, das 1% Serum enthielt. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation wurden zu einem Satz Makrophagen (eine 12-Napfplatte) 150 µg Mikrokügelchen mit 1,4 Gew.-% Rifampicin dosiert, zu einem zweiten Satz (eine 12-Napfplatte) wurden 150 µg Placebomikrokügelchen dosiert und ein dritter Satz (eine 12-Napfplatte) wurde als Reagenzkontrolle behalten. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die anhaftenden Makrophagen dreimal gewaschen, um nicht phagozytisierte Mikrokügelchen zu entfernen (was durch mikroskopische Beobachtung gezeigt wird). 300 µl steriles 0,125% SDS in Wasser (Sigma) wurde jedem Napf zugegeben und die Platten kurz mit der Hand geschüttelt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Inhalte von 4 Nöpfen in sterilen PYREX-Schraubverschlussröhrchen zusammengefasst. Die Nöpfe wurden dreimal mit sterilem Wasser (Sigma) gewaschen, das in die Röhrchen gegeben wurde. Dies führte zu drei gepoolten Proben pro Platte. Die Proben wurden eingefroren und lyophilisiert.

[0081] Nach der Lyophilisierung wurden 400 µl Ethylacetat (zertifiziert, A.C.S., Fisher) in jedes Röhrchen gegeben und die Röhrchen über Nacht geschüttelt. Ethylacetat löst das Mikrokügelchenpolymer und setzt Rifampicin frei. Die Röhrchen wurden dann in einen Exsikkator gestellt und die Atmosphäre mit einer Vakuumpumpe 6 Stunden lang evakuiert. Die Proben wurden dann mit 320 µl J774-Medium, das 1 % Serum enthielt, rekonstituiert und der Rifampicin-Bioassay durchgeführt, wie oben beschrieben.

Herstellung von Mycobakterien zur Infektion

[0082] Vor der Infektion von Monozytenzelllinie wurde Mycobacterium tuberculosis H37Rv anfangs in Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), das 0,5% Tween 80 (Sigma) und 10% Albumin-Dextrose-Katalase (ADC) (Difco) enthielt, gezüchtet. Nachdem die Mycobakterien die exponentielle Phase erreicht hatten, wurden sie durch Verwirbeln mit Glaskügelchen dispergiert und die Klumpen wurden 30 Minuten lang absetzen gelassen. Der Überstand wurde entfernt, Aliquots gebildet, bei -70°C eingefroren und dann aufgetaut und zur Infektion verwendet durch Resuspension in einem geeigneten Zellkulturmedium. Die tatsächlichen CFUs/ml wurden bestimmt durch Erstellung von Reihenverdünnungen in Dulbecco's PBS (DPBS, Mediatech, Inc., Herndon, VA) und Plattieren auf 7H 10-Agar.

Infektion von Monozyten

[0083] Vor der Infektion wurden J774-Zellen auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen pro ml pro Napf in 12-Napf-Gewebekulturschalen (Falcon) plattiert. Nachdem die Zellen über Nacht anhaften gelassen wurden, wurde das Medium durch frisches Medium, das 1 Serum enthielt, ersetzt, um die Zellvermehrung zu reduzieren. Nach 48 Stunden wurden die anhängenden Zellen mithilfe eines Okulargitters gezählt, um die Anzahl der Makrophagen zu bestimmen. Mycobakterien wurden in RPMI-1640, das 1 % fötales Rinderserum enthielt, suspendiert und die Suspension wurde in einzelne Nöpfe mit einer Dichte von 5 Mycobakterien pro Makrophage abgegeben. Infizierte J774-Zellen wurden dann bei 37°C in einer Atmosphäre, die 5% Kohlendioxid enthielt, 4 Stunden lang inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit DPBS (Mediatech) gewaschen, um nicht phagozytisierte Mycobakterien zu entfernen. Frisches Medium (1,0 ml) mit oder ohne Mikrokügelchenpräparate oder freies Rifampicin wurden dann jedem Napf zugegeben und die Versuche bis zum Abschluss fortgesetzt. 1 ml frisches Medium wurde am Tag 4 zugefügt.

[0084] Vor der Infektion wurden die MM6-Zellen auf 8×10^5 Zellen pro ml eingestellt und 0,5 ml pro Napf wurden in 12-Napf-Gewebekulturschalen (Corning Costar Corp., Cambridge, Mass.) abgegeben. Die Mycobakterien wurden dann den MM6-Zellen zugefügt, um ein endgültiges Verhältnis von 20 Mycobakterien pro Makrophage zu erzielen mit einer Dichte von 4×10^5 MM6 pro 1,0 ml pro Napf. Nach 4-stündiger Infektion wurden die infizierten MM6-Zellen durch Zentrifugation (200 × g) gesammelt und zweimal mit Dulbecco's phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS, Mediatech) gewaschen, um jegliche nicht phagozytisierten Mycobakterien zu entfernen. Die Zellen wurden dann mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro 1,0 ml pro Napf wieder plattiert, wobei geeignete Nöpfe Mikrokügelchenpräparate enthielten und die Platten wurden bei 37°C mit 5% Kohlendioxid inkubiert. 1 ml frisches Medium wurde am Tag 4 zugefügt und die Infektion fortgesetzt bis zum CFU-Assay.

Bestimmung der CFU

[0085] Die Bestimmung der CFU zur Stunde 0 wurde durchgeführt, indem zuerst die Monozyten mit 0,25% (G/V) Natriumdodecylsulfat (SDS) in DPBS lysiert wurden, dann Reihenverdünnungen auf 7H10-Agarplatten plattiert wurden. Als Mittel, um die Viskosität zu verringern, wurden 5 µl (5 U Aktivität) RQ DNase (Promega Corp., Madison, Wis.) mit MgSO₄ (5 mM) in jeden Napf gegeben gefolgt von der Zugabe von SDS und die Platten wurden bei 37°C 20 Minuten lang inkubiert. Das Plattierungsverfahren wurde nach 7 Tagen wiederholt und die CFU nach 10 bis 14 Tagen Inkubation der Kulturen gezählt.

Ergebnisse von Beispiel 1

Eigenschaften von Mikrokügelchenpräparaten

[0086] Repräsentative mit Rifampicin beladene Mikrokügelchen werden in Tabelle 1 beschrieben. Die Präparate 5 und 6 wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Tabelle 1: Repräsentative Präparate von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen

Präparat Nr.	Träger	Trägerlösungsmittel	Rifampicingehalt, Gew.-% theoret./gefunden	Mikrokügelchengröße, µm ^a	In-vitro-Freisetzung (%) nach 2 Tagen
1	60:40 DL-PLG	Methylenchlorid	2/0,62	15	0
2	60:40 DL-PLG	Ethylacetat	5/0,25	8,3	5
3	60:40 DL-PLG	Methylenchlorid	5/3,1	10	2
4	60:40 DL-PLG	Methylenchlorid	5/2,9	8,9	3,8
5	60:40/50:50 DL-PLG ^b	Methylenchlorid	5/1,4	7,5	8,0
6	60:40/50:50 DL-PLG ^b	Methylenchlorid	5/1,8	8,8	7,0
7	60:40/50:50 DL-PLG ^b	Methylenchlorid/CMC ^c	5/3,2	14,7	NA

^a Daten angegeben als 90 Volumenpercentil

^b Träger ist eine Mischung aus 60:40 DL-PLG und 50:50 DL-PLG mit niedrigem Molekulargewicht (i.v. 0,23 dl/g)

^c CMC: Natriumcarboxymethylcellulose wurde als Tensid verwendet. Bei allen anderen wurde PVA als Tensid verwendet.

In-vitro-Freisetzung von Mikrokügelchenpräparaten

[0087] Anfangs wurden mit Rifampicin beladene Mikrokügelchenpräparate bezüglich der in-vitro-Freisetzung nach 2 Tagen ausgewertet. Bezogen auf diese Information und andere Eigenschaften, einschließlich Rifampicingehalt und Mikrokügelchengröße, wurden dann Präparate ausgewählt für die Auswertung einer längeren in-vitro-Freisetzung (Tabelle 1). Um zu den 7-tägigen Makrophagenversuchen zu passen, wurde die längere Freisetzung 6 Tage lang ausgewertet. Die Präparate 4, 5 und 6 wurden für diese verlängerten Untersuchungen ausgewählt, die in [Fig. 1](#) angegeben sind. Die Präparate 5 und 6 erzeugten die besten in-vitro-Freisetzungsmuster, was nach 6 Tagen zu 21 bzw. 12% kumulativer in-vitro-Wirkstofffreisetzung führte ([Fig. 1](#)).

Mikrokügelchengrößenverteilung und Oberflächenmorphologie

[0088] Bei jedem Mikrokügelchenpräparat wurden die Größenverteilung und Oberflächenmorphologie ausgewertet, um optimale Abgabeeigenschaften an Makrophagen sicherzustellen. Die Größenverteilung für die Präparate 5 und 6 ist in den [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) angegeben. Die Oberflächenmorphologie des Mikrokügelchenpräparats 5 ist in den [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) gezeigt.

Freisetzung von Rifampicin aus Makrophagen, die mit verschiedenen Mikrokügelchenpräparaten behandelt wurden

[0089] Bevor die Versuche durchgeführt wurden, um die Wirksamkeit von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen auf intrazellulär replizierende Mycobakterien festzustellen, war es notwendig, die Freisetzungseigenschaften von Mikrokügelchenpräparaten innerhalb der Makrophagen zu bestimmen. Drei Präparate wurden für diesen Zweck ausgewählt, die Präparate 5, 6 und 7 (Tabelle 2). Jedes dieser Präparate wird in Tabelle 1 beschrieben.

[0090] Von den drei Präparaten lieferte Präparat 5 das beste Freisetzungsmuster sowohl bei der MM6- als auch der J774-Monozytenzelllinie (Tabelle 2). Am Ende der 7 Tage lieferte die Freisetzung aus diesem Präparat eine um 2,6- bzw. 8,1-fach größere Konzentration an Rifampicin in MM6, als die Präparate 6 bzw. 7 (Tabelle 2). In J774 war die Freisetzung aus Präparat 5 am Ende der 7 Tage um das 2,7- bzw. 1,5-fache größer als aus den Präparaten 6 bzw. 7 (Tabelle 2). Aus diesem Grund wurde Präparat 5 für intensivere Untersuchungen an Makrophagen ausgewählt.

Tabelle 2

Freisetzungseigenschaften von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchenpräparaten in MM6- und J774-Monozytenzelllinien. Die Versuche wurden 7 Tage lang durchgeführt. Die Rifampicinkonzentration in Zellüberständen wurde mithilfe eines biologischen Assays quantitativ ausgewertet. Jeder Versuch wurde dreifach durchgeführt und ist als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben

Zeit (Tage)	MM6 Präparat 5 ($\mu\text{g RIF/ml}$)	MM6 Präp. 6 ($\mu\text{g RIF/ml}$)	MM6 Präp. 7 ($\mu\text{g RIF/ml}$)	J774 Präp. 5 ($\mu\text{g RIF/ml}$)	J774 Präp. 6 ($\mu\text{g RIF/ml}$)	J774 Präp. 7 ($\mu\text{g RIF/ml}$)
2	<0,008 ¹	<0,008 ¹	<0,008	0,026 $\pm$ 0,006	<0,008	<0,008 ¹
4	0,037 $\pm$ 0,005	0,0011 $\pm$ 0,0	0,009 $\pm$ 0,0002	0,026 $\pm$ 0,004	0,0084 $\pm$ 0,0006	0,0097 $\pm$ 0,0008
7	0,044 $\pm$ 0,001	0,017 $\pm$ 0,002	0,0054 $\pm$ 0,001	0,040 $\pm$ 0,005	0,015 $\pm$ 0,001	0,026 $\pm$ 0,002

¹ Nachweisbarer Pegel des biologischen Assays ist 0,008 $\mu\text{g/ml}$

Tests zur Makrophagenlebensfähigkeit

[0091] Um die Wirkungen von Mikrokügelchenpräparaten auf Makrophagen zu untersuchen, wurden Lebensfähigkeitstests mit der MM6-Humanmonozytenzelllinie durchgeführt. Die Wirkung von freiem Wirkstoff und äquivalentem Wirkstoff, der über Mikrokügelchen abgegeben wird, auf die Makrophagenlebensfähigkeit ist in Tabelle 3 angegeben. Die MIC für den *M. tuberculosis* H37Rv-Stamm, der bei dieser Untersuchung verwendet wurde, ist 0,06 bis 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Drei Dosen wurden getestet aufgrund des höheren MIC-Werts und es waren 0,25, 0,75 und 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Zur Behandlung mit Mikrokügelchenpräparaten wurden äquivalente Dosen verwendet bezogen auf den Beladungsprozentanteil für das spezielle Präparat. In diesem Fall enthielt das Präparat 1,4 Gew.-% Rifampicin (Präparat 5, siehe oben), daher waren 18, 54 bzw. 143 μg Mikrokügelchenpräparat notwendig, um ausreichend Rifampicin für MIC-, Dreifach-MIC- ($3 \times \text{MIC}$) und Achtfach-MIC- ($8 \times \text{MIC}$)-Konzentrationen abzugeben (Tabelle 3).

Tabelle 3

Wirkung von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen auf die Lebensfähigkeit von Makrophagen am Ende einer 7-tägigen Dosierung. Mikrokügelchenpräparat 5 (1,4 Gew.-% Rifampicin) wurde in diesen Versuchen verwendet

Faktor	Menge an Rifampicin (µg/ml)	Wirkung auf MM6 (% Lebensfähigkeit nach 7 Tagen)	Menge an Mikrokügelchen, die notwendig sind, um eine äquivalente Konzentration an Rifampicin abzugeben (µg/ml)	Wirkung auf MM6 (% Lebensfähigkeit nach 7 Tagen)
MIC	0,25	91	18	100
3 x MIC	0,75	77	54	100
8 x MIC	2,0	42	143	92

[0092] In vorherigen Versuchen (Daten nicht gezeigt) wurde das untere Ende des MIC-Bereichs (0,06 µg/ml) für mit Rifampicin beladene Mikrokügelchen verwendet. Es wurde jedoch aufgrund des Prozentanteils der Freisetzung aus Mikrokügelchen während des Versuchszeitraums eine Reduktion des mycobakteriellen intrazellulären Wachstums beobachtet, aber diese war nicht signifikant. Bei höheren MIC-Äquivalenten, die in Tabelle 3 dargestellt sind, war es möglich, signifikante Reduktionen im mycobakteriellen Wachstum mit den Mikrokügelchenpräparaten zu erhalten (siehe **Fig. 4**). Bei diesen Konzentrationen wurde beobachtet, dass Rifampicin, das von Mikrokügelchen abgegeben wird, eine reduzierte Toxizität hatte, im Vergleich zu Rifampicin, das in äquivalenten Konzentrationen extrazellulär abgegeben wurde (Tabelle 3).

Wirksamkeit von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen auf das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis*

[0093] Die antimycobakterielle Wirksamkeit von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen wurde sowohl in Maus-J774- als auch Human-MM6-Monozytenzelllinien untersucht. Nach Infektionen der monozytischen Zelllinie mit *M. tuberculosis* H37Rv wurden Zellen entweder mit Rifampicin, das direkt dem Kulturmedium zugegeben wurde, oder mithilfe von wirkstoffbeladenen Mikrokügelchen behandelt. Infizierte Zellen wurden mit Rifampicinkonzentrationen behandelt, die der MIC (d.h. 0,25 µg Rifampicin/ml) und der 3- und 8-fachen MIC-Konzentration (d.h. 0,75 bzw. 2,0 µg Rifampicin/ml) (**Fig. 4**) entsprachen.

[0094] In der J774-Mauszelllinie wurde eine signifikante Reduktion der CFUs ($P < 0,001$) für alle drei Konzentrationen von Rifampicin, die als freier Wirkstoff gegeben wurden, beobachtet (**Fig. 4A**). Für Rifampicin, das in Mikrokügelchenpräparat 5 (1,4 Gew.-%) abgegeben wurde, führten die 3 × MIC- und 8 × MIC-Konzentrationen beide zu signifikanten Reduktionen der CFUs ($P < 0,001$) nach 7 Tagen (**Fig. 4A**). Die mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen, die in einer Konzentration äquivalent der MIC (d.h. 0,25 µg/ml) gegeben wurden, verursachten keine signifikante Reduktion der CFUs nach 7 Tagen (**Fig. 4A**). Extrapoliert aus Daten, die in Tabelle 2 dargestellt sind, wurde jedoch nur 8% des Rifampicins aus den Mikrokügelchenpräparaten am Tag 7 freigesetzt. Trotzdem wurde eine signifikante Reduktion der CFUs beobachtet bei Mikrokügelchen, die mit 3 × MIC entsprechendem und 8 × MIC entsprechendem Rifampicin beladen waren. Bei der MM6-Zelllinie wurde eine signifikante Reduktion der CFUs bei allen Konzentrationen an freiem Rifampicin ($P < 0,001$) ebenso wie bei äquivalenten Konzentrationen von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen ($P < 0,05$, $< 0,001$ bzw. $< 0,001$ für MIC, 3 × MIC bzw. 8 × MIC) beobachtet (**Fig. 4B**).

Wirksamkeit der Wirkstoffabgabe durch Mikrokügelchen im Vergleich zu freiem Wirkstoff

[0095] Mehrere Versuche wurden durchgeführt, um (1) die Menge an Rifampicin, die an Makrophagen abgegeben wurde mit Mikrokügelchen nach 24 Stunden Füttern vor der Infektion zu bestimmen und (2) die Wirksamkeit dieser Dosis mit einer äquivalenten Dosis an freiem Wirkstoff zu vergleichen. Zuerst ließ man die J774-Mausmakrophagenzelllinie mit Rifampicin beladene Mikrokügelchen (Präparat 5, 1,4 Gew.-% Rifampicin) 24 Stunden lang phagozytisieren. Unter Verwendung des biologischen Assays wurde die mittlere Konzentration an Rifampicin, die von den Mikrokügelchen abgegeben wurde, als $0,094 \pm 0,003$ µg/Napf ($n = 9$) bestimmt. Diese Information wurde dann verwendet, um drei aufeinander folgende Versuche in dreifachem An-

satz durchzuführen, um die Wirksamkeit äquivalenter Dosen von Rifampicin, die extrazellulär gegeben wurden, zu vergleichen. In jeder Gruppe wurden J774-Zellen mit *M. tuberculosis* H37Rv infiziert und entweder nicht behandelt, mit freiem Rifampicin behandelt oder mit mit Rifampicin beladenem Mikrokügelchenpräparat 5 behandelt. Die experimentellen Daten für alle drei Versuche sind in den [Fig. 5A](#) bis C angegeben. Die mittlere freie Wirkstoffkonzentration, die verwendet wurde, um infizierte Makrophagen zu behandeln, war $0,09 \pm 0,002 \mu\text{g}$ Rifampicin/Napf ($n = 9$) und die mittlere Konzentration von Rifampicin, die durch Gesamtfreisetzung aus Mikrokügelchen abgegeben wurde, war $0,097 \pm 0,008 \text{ mg/Napf}$ ($n = 9$). In jedem Versuch konnten Dosen von Rifampicin, die mithilfe von Mikrokügelchenpräparaten abgegeben wurden, die CFUs signifikant reduzieren verglichen mit nicht behandelten Kontrollen (P wurde bestimmt als $\leq 0,001$ für jeden Versuch) ([Fig. 5A–C](#)). Dosen von Rifampicin, die von Mikrokügelchen abgegeben wurden, konnten CFUs signifikant vermindern im Vergleich zu äquivalenten Dosen, die als freier Wirkstoff gegeben wurden (P wurde bestimmt als $\leq 0,001$ für jeden Versuch) ([Fig. 5A–C](#)).

Beispiel 2: In-vivo-Mausstudien

Herstellung von großen ($> 10 \mu\text{m}$) Mikrokügelchen für eine verlängerte Freisetzung von Rifampicin

[0096] Das Verfahren, das verwendet wurde, um große Mikrokügelchen herzustellen, die vorgesehen waren, um Rifampicin über längere Zeit freizusetzen, war ähnlich dem Verfahren, das verwendet wurde, um die kleinen Mikrokügelchen herzustellen, die in Beispiel 1 beschrieben wurden. Eine Trägerlösung wurde hergestellt, indem 4,0 g DL-PLG in 16,0 g organischem Lösungsmittel, in diesem Fall Methylenchlorid oder Ethylacetat, gelöst wurden. Ungefähr 1 g Rifampicin wurde in die Trägerlösung eingeleitet und wiederum wurde nach sorgfältigem 20 ± 10 Sekunden langen Vermischen eine homogene Lösung erhalten. Die Rifampicin/DL-PLG-Lösung wurde in ein wässriges Prozessmedium eingeleitet, das aus 2,0 Gew.-% PVA bestand. Eine Emulsion wurde gebildet unter Verwendung eines Standardlabormischers und wiederum in 5,0 l Wasser überführt. Die entstehenden Mikrokügelchen wurden über Standard-ASTM-Mesh-Sieben (Fisher Scientific) gesammelt.

[0097] Mikrokügelchen wurden durch Gammabestrahlung (25 kGy) vor der Verwendung in Mäusen sterilisiert. Jede Mikrokügelchencharge wurde auf Wirkstoffgehalt durch spektrofotometrische und HPLC-Assays, auf Größe, mit Standardverfahren unter Verwendung eines Malvern Teilchengrößenanalysegeräts und Abgabeeigenschaften vor der Verwendung in Mäusen analysiert. Passende Placebopräparate wurden für jedes mit Wirkstoff beladene Präparat hergestellt. Beispielhafte Formulierungen, einschließlich des beobachteten Wirkstoffgehalts (Gew.-%), Größe und in-vitro-Freisetzungseigenschaften sind in Tabelle 4 und [Fig. 6](#) angegeben.

Tabelle 4: Repräsentative Präparate von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen

Präparat Nr. (Char- gen-Nr.)	Träger	Trägerlö- sungsmit- tel	Rifampicingehalt, Gew.-% theoret./gefunden	Mikrokügel- chengröße, μm^a	In-vitro- Freisetzung (5) nach 2 Tagen
1 (1290-00)	60:40 DL-PLG	Ethyl- acetat	30/1,38	101,1	NA
2 (1290-006)	60:40 DL-PLG	Ethyl- acetat	30/18	106,1	2
3 (1290-031)	50:50 DL-PLG	Methylen- chlorid	30/19	110,7	5
4 (1290-049)	65:35 DL-PLG	Ethyl- acetat	30/17,6	68,4	15
5 (1290-107)	60:40 DL-PLG ^b	Ethyl- acetat	30/17	106,1	25
6 (1290-104)	60:40/50:50 DL-PLG ^c	Ethyl- acetat	30/27	101,1	2,5
7 (1463-038)	60:40/50:50 DL-PLG ^c	Ethyl- acetat	30/25,7	130,2	1,8

^a Daten angegeben als 90 Volumenpercentil

^b Mikrokügelchen hergestellt durch Einarbeitung von Dextrose

^c Träger ist eine Mischung aus 60:40 DL-PLG und 50:50 DL-PLG mit geringem Molekulargewicht

[0098] Die Mikrokügelchenpräparate wurden auch bezüglich der Oberflächenmorphologie und Größenverteilung ausgewertet, um optimale Abgabe- und Freisetzungsparmeter sicherzustellen. Die typische Morphologie der großen Mikrokügelchen ist in den [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) dargestellt, die einen Querschnitt eines beispielhaften großen Mikrokügelchens zeigen. Die Größenverteilungen, bestimmt unter Verwendung eines Malvern-Teilchengrößenanalysegeräts sind für die Formulierungen 6 und 7 in den [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) angegeben.

Freies Rifampicinpräparat

[0099] Rifampicin (Sigma Chemical Company, St. Louis) wurde auch als Suspension für eine tägliche orale Gabe in einer Lösung von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Gewebekulturqualität, Sigma) in steriler 0,9%iger Natriumchlorid-(zur Injektion, Baxter)-Lösung hergestellt.

Herstellung von kleinen (1 bis 10 μm) Rifampicinmikrokügelchen

[0100] Kleine Mikrokügelchen wurden hergestellt, wie in den Chargen 5 und 6 von Beispiel 1.

Mycobakterielle Stämme

[0101] *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294, SRI #1345) wurden erhalten, wie in Beispiel 1.

Biologischer Assay

[0102] Ein biologischer Assay unter Verwendung von *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), im Wesentlichen wie in Beispiel 1 beschrieben, wurde verwendet, um Rifampicinkonzentrationen in Mausplasma zu bestimmen. Der biologische Assay wurde leicht modifiziert, indem die Standardkurve für Rifampicin in steril filtriertem Kontrollmausplasma anstelle von Kulturmedium erstellt wurde.

Mäuse

[0103] Weibliche CD-1-Mäuse (14 bis 16 g) wurden von Charles River Laboratories erhalten und auf einer Diät von Teklad sterilisierbarem Laborfutter (Harlan) und Wasser in einer Einrichtung mit biologischer Sicherheit Grad III während der Studien gehalten.

Infektion und Behandlung der Mäuse

[0104] Mäuse wurden über die laterale Schwanzvene am Tag 0 mit ungefähr 10^5 lebensfähigen Bacilli von *Mycobacterium tuberculosis*, Stamm H37Rv in einem Volumen von 0,1 ml 0,9% steriler Natriumchloridlösung geimpft. Wirkstoffbehandlungen wurden ungefähr 2 bis 4 Stunden nach der Impfung gestartet. Jede Behandlungsgruppe wies 10 Mäuse auf. Präparate aus kleinen Mikrokügelchen, Placebo und mit Rifampicin beladen, wurden intraperitoneal an den Tagen 0 und 7 in einer 32- bis 50-mg-Dosis, die in einem Volumen von 0,25 ml steriler Kochsalzlösung suspendiert war, unter Verwendung einer sterilen Tuberkulinspritze mit einer 23-Gauge-Nadel injiziert. Präparate von großen Mikrokügelchen aus den Chargen 6 und 7, Placebo und mit Rifampicin beladen, wurden in einer 100-mg-Dosis, die in einem 0,5-ml-Volumen des Vehikels, das aus 0,5 Gew.-% Carboxymethylcellulose mit 0,1 Gew.-% Tween 80 und 5 Gew.-% Mannit bestand, suspendiert war, nur am Tag 0 über den dorsalen Thoracolumbarbereich unter Verwendung einer 18-Gauge-Nadel, die an einer sterilen Tuberkulinspritze befestigt war, subcutan verabreicht. Die Mäuse wurden mit Ketamin-Xylazin (10 mg/100 g Körpergewicht bzw. 1,5 mg/100 g Körpergewicht, intramuskulär gegeben) während der subcutanen Injektion unter allgemeiner Anästhesie gehalten. Eine orale Gabe von Rifampicin wurde täglich von Tag 0 bis Tag 25 durchgeführt. Eine Dosierungsrate von 0,1 ml pro 100 g Körpergewicht wurde täglich an jede Maus je nach individuellem Gewicht mit einer Lösung von Rifampicin verabreicht, was die folgenden Dosen lieferte: 36, 20, 10, 5, 1,25 und 0,42 mg/kg. Die Mäuse wurden genommen und erhielten die Gabe unter Verwendung einer rostfreien Fütterungsnadel, die mit der Tuberkulinspritze verbunden war. Alle Mäuse wurden täglich gewogen und auf klinische Zeichen von Toxizität untersucht. Am Tag 26 wurden die Mäuse durch Kohlendioxidinhalation für das aseptische Sammeln von Lungen und Milz getötet. Die Organe wurden einzeln in sterilen Tekmarsäcken eingefroren, aufgetaut, manuell homogenisiert mit einem Bayer-Roller, verdünnt mit steriler Kochsalzlösung, die 0,05% Tween 80 enthielt, und auf mit OACD ergänztem 7HII-Middlebrook *Mycobacterium*-Festagar plattiert. Die Kolonien wurden nach 14 bis 21 Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ in einem Inkubator gezählt.

[0105] Zur Entnahme von Plasmaproben, die mit dem biologischen Assay untersucht werden sollten, wurde das folgende Verfahren verwendet. Kurz gesagt, wurden Mäuse mit Ketamin-Xylazin-Anästhesie anästhesiert für eine aseptische Blutentnahme unter Verwendung einer sterilen Tuberkulinspritze mit heparinisierter Nadel, um Volumina von 0,5 bis 1,0 ml Blut aus dem Herzen abzuziehen. Die Mäuse wurden sofort nach der Blutentnahme mit CO₂ getötet. Das Blut wurde kurz zentrifugiert und Plasma gesammelt und bis zum Test bei -70°C eingefroren.

Wirkungen von Mikrokügelchenpräparaten auf Mäuse

[0106] Allgemein wurden alle Mikrokügelchenpräparate von den Mäusen gut toleriert. Bei kleinen Mikrokügelchen wurde eine leichte Reduktion des mittleren Körpergewichts aufgezeichnet für Gruppen, die kleine Placebo am Tag 3 erhielten ([Fig. 9A](#)). Einige dieser Tiere zeigten ein leicht belegtes Aussehen an den Tagen 1 und 2. Am Tag 6 erschienen die Mäuse klinisch normal und hatten ihr Gewicht wiedergewonnen. Mäuse, die mit Placebo oder mit Rifampicin beladenen großen Mikrokügelchen behandelt wurden, tolerierten die Präparate sehr gut ([Fig. 9B](#)). Alle Mäuse zeigten normales klinisches Verhalten, nahmen weiterhin Futter und Wasser auf und zeigten kein anomales Verhalten, das auf die Injektionsstellen gerichtet war (z.B. Kauen, Beißen). Nach der Tötung zeigten die Untersuchungen nach dem Tod subcutane Ablagerungen von Mikrokügelchen bei Mäusen, die die großen Präparate erhalten hatten. Mit Rifampicin beladene Präparate waren noch deutlich orange, während Placebopräparate weiß waren. Ebenso wurden intraperitoneale Mikrokügelchen in Mäusen beobachtet, die kleine Präparate erhalten hatten. Wiederum waren die mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen deutlich orange, während Placebopräparate weiß waren. Intraperitoneal verabreichte Mikrokügelchen hafteten an verschiedenen Abdominalorganen, einschließlich Milz, Leber und Darm. Die Gegenwart von Mikrokügelchen schien keine Adhäsionen oder andere negative Zustände zu verursachen.

Freisetzungseigenschaften in Mäusen

[0107] Bevor Versuche, die infizierte Mäuse betrafen, durchgeführt wurden, wurde die Freisetzung von mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen in vivo quantitativ ausgewertet, um die Verwendung von Mikrokügelchen in einem infizierten Tiermodell zu rationalisieren. Dies wurde erreicht, indem Mäusen entweder kleine

oder große Mikrokügelchenpräparate injiziert wurden und freies Rifampicin oral verabreicht wurde und anschließend während eines Versuchszeitraums, der das Doppelte des infizierten Tiermodells von 26 Tagen war, die Plasmapegel kontrolliert wurden. [Fig. 10](#) zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs.

Behandlung von mit *M. tuberculosis* infizierten Mäusen mit oralen und Mikrokügelchenpräparaten von Rifampicin

[0108] Mäuse wurden mit *M. tuberculosis* H37Rv infiziert und entweder mit oralen Dosen von Rifampicin oder mit Mikrokügelchenpräparaten von Rifampicin behandelt. Orale Dosen von Rifampicin wurden täglich bis zu 25 Tage nach der Infektion in Mengen gegeben, die von 0,42 mg Rifampicin/kg bis 10 mg Rifampicin/kg/Tag variierten. Für Mäuse, die Rifampicin in Form von großen Mikrokügelchen erhielten, wurde nur eine Behandlung zum Zeitpunkt der Infektion verabreicht. Für Mäuse, die Rifampicin durch kleine Mikrokügelchenpräparate erhielten, wurden zwei Behandlungen gegeben. Eine wurde zum Zeitpunkt der Infektion gegeben und eine wurde 7 Tage nach der Infektion gegeben. Keine andere Wirkstofftherapie wurde den Mäusen, die Mikrokügelchenpräparate erhielten, gegeben. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5 und 6 angegeben.

Ergebnisse von Beispiel 2

[0109] Bei oraler Verabreichung von Rifampicin mit Konzentrationen von 0,42, 1,25 und 2,5 mg/kg wurde keine signifikante Reduktion von lebensfähigen *M. tuberculosis* H37Rv 26 Tage nach Infektion beobachtet (Tabelle 5). Bei Mäusen, die orale Konzentrationen von 5,0 und 10 mg Rifampicin/kg erhielten, wurden signifikante Reduktionen der lebensfähigen *M. tuberculosis* H37Rv 26 Tage nach Infektion beobachtet (Tabelle 5).

Tabelle 5

Mäuse, die mit *M. tuberculosis* H37Rv infiziert sind und mit Rifampicin oral behandelt wurden. Die Daten sind angegeben in log₁₀ CFU

Maus Nr.	DMSO	0,42 mg/kg	1,25 mg/kg	2,5 mg/kg	5,0 mg/kg	10 mg/kg
1	5,69	5,86	5,97	5,56	5,45	4,27
2	5,6	5,66	5,71	5,30	5,31	4,72
3	5,83	5,59	5,69	5,87	5,10	4,15
4	5,52	5,72	5,64	5,2	5,43	4,00
5	5,61	5,95	5,47	5,11	5,06	3,48
6	5,7	5,88	5,44	5,69	5,18	4,54
7	5,51	5,86	5,62	5,44	5,20	3,30
8	5,75	5,7	5,88	5,79	5,18	3,00
9	6,02	6,15	5,72	5,67	5,51	4,48
10	NA	NA	NA	5,48	5,32	NA
Durchschnittswert	5,69	5,82	5,68	5,51	5,27	3,99
SEM	0,05	0,06	0,06	0,08	0,05	0,20
P	NA	>0,05	>0,05	>0,5	<0,0001	<0,0001

[0110] Die Behandlung von mit *M. tuberculosis* H37Rv-infizierten Mäusen mit kleinem Mikrokügelchenpräparat alleine führte nicht zu einer signifikanten Reduktion der lebensfähigen Mycobakterien nach 26 Tagen (Tabelle 6). Die Behandlung entweder mit dem großen Präparat oder einer Kombination von kleinen und großen Formulierungen führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion von lebensfähigen *M. tuberculosis* H37Rv 26 Tage nach Infektion (Tabelle 6). Außerdem zeigten von 10 Mäusen, die mit dem großen Präparat behandelt worden waren, zwei keine nachweisbaren CFUs am Tag 26 bei der geringsten Verdünnung ausplattiert (10^{-3}) (Tabelle 6). Ebenso wurden bei 4 von 10 Mäusen, die mit einer Kombination aus kleinen und großen Mikrokügelchen behandelt wurden, keine nachweisbaren CFUs am Tag 26 nach 10^{-3} -Verdünnung gezeigt (Tabelle 6). Drei weitere Gruppen, die jeweils aus 10 infizierten Mäusen bestanden, erhielten Placebopräparate von kleinen, großen bzw. kleinen plus großen Mikrokügelchen. Es wurde keine signifikante Reduktion der CFUs in diesen Gruppen 26 Tage nach Infektion beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6

Mäuse, die mit *M. tuberculosis* H37Rv infiziert waren und mit kleinen (Präparat S6, 1,8 Gew.-%), großen (Präparat 7, 25,7 Gew.-%) bzw. kleinen und großen Mikrokügelchen (Präparate S6 bzw. 7) behandelt wurden. Die Daten sind angegeben in $\log_{10}$ CFU in Lungen

Maus Nr.	DMSO $\log_{10}$ CFU	Kleine Mikrokü- gelchen $\log_{10}$ CFU	Große Mikrokü- gelchen $\log_{10}$ CFU	Kleine + große Mikrokügelchen $\log_{10}$ CFU
1	5,43	5,67	4,40	4,48
2	6,2	5,46	3,00 ^a	3,00 ^a
3	5,69	5,43	5,08	5,18
4	5,67	5,45	3,00 ^a	3,00 ^a
5	6,18	5,44	5,43	3,00 ^a
6	5,82	5,57	5,00	3,00 ^a
7	5,08	5,69	4,90	5,41
8	5,11	5,69	5,50	4,70
9	6,00	5,06	5,18	5,81
10	4,95	NA	NA	6,20
Mittelwert	5,61	5,50	4,61	4,38
SEM	0,14	0,07	0,32	0,41
P	NA	0,50	0,008	0,03

^a Geringste Verdünnung war 10^{-3} , daher bedeutet der Wert von 3,0, dass keine CFU für diese Mäuse nachgewiesen wurden.

[0111] Plasmapegel an Rifampicin in mit Mikrokügelchen behandelten Mäusen nach der Thera-Nach dem oben beschriebenen Versuch mit einer *M. tuberculosis*-H37Rv-Infektion wurden Plasmaproben von Mäusen direkt nach dem Ende des Experiments verarbeitet. Plasmapegel von Rifampicin wurden dann mit dem Bioassayverfahren quantitativ ausgewertet. 4 von 9 Mäusen (44%), die nur mit dem Präparat mit kleinen Rifampicin-mikrokügelchen behandelt worden waren, hatten nachweisbare Pegel von Rifampicin im Plasma, in einem Bereich von 0,11 bis 0,20 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 7). 5 von 9 Mäusen, die das kleine Präparat erhalten hatten, hatten keine nachweisbaren Pegel von Rifampicin (Tabelle 7). Plasma von Mäusen, die nur mit dem Präparat mit großen Rifampicinmikrokügelchen behandelt worden waren, zeigte nachweisbare Pegel von Rifampicin bei 6 von 9 (67%), in einem Bereich von 0,15 bis 2,69 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 7). In der Gruppe der Mäuse, die eine Kombination aus kleinen und großen mit Rifampicin beladenen Mikrokügelchen erhielten, hatten 9 von 9 Mäusen (100%) nachweisbare Pegel von Rifampicin in ihrem Plasma im Bereich von 0,15 bis 2,69 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 7).

Tabelle 7

Plasmapegel in infizierten Mäusen 26 Tage nach Infektion (μg Rifampicin/ml Plasma). Die kleinen bzw. großen Präparate waren S6 (1,8 Gew.-%) bzw. 7 (25,7 Gew.-%).

Maus Nr.	Kleine Mikrokügelchen	Große Mikrokügelchen	Kleine + große Mikrokügelchen
1	0,10	0,16	0,26
2	0,15	1,51	0,84
3	0,20	0,20	0,15
4	0,11	2,69	2,69
5	<0,10	0,15	1,51
6	<0,10	0,20	1,13
7	<0,10	<0,10	0,26
8	<0,10	<0,10	0,26
9	<0,10	<0,10	0,35
Durchschnittswert ^a	0,14	0,82	0,83
SEM	$\pm 0,02$	$\pm 0,43$	$\pm 0,28$
Bereich	<0,10 - 0,20	<0,10 - 2,69	0,15 - 2,69

^a Durchschnittswert angegeben für Proben mit nachweisbarem Pegel von Rifampicin

Beispiel 3: In-vivo-Primatenstudien

[0112] Im Fall von Tuberkulose bei Primaten liegt die MIC für Rifampicin in einem Bereich von 0,06 bis –0,25 μg Rifampicin/ml. Diese Konzentration kann bei Primaten, die mit *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infiziert sind, erreicht werden unter Verwendung des folgenden Injektionsplans:

Tag 0:

2.000 mg kleine Mikrokügelchen (5,8 Gew.-% Rifampicin) intravenös injizieren
Gesamtrifampicin = 116 mg

Tag 7:

2.000 mg große Mikrokügelchen (23 Gew.-% Rifampicin) subcutan an mehreren Stellen injizieren
Gesamtrifampicin = 460 mg
2.000 mg kleine Mikrokügelchen (5,8 Gew.-% Rifampicin) intravenös injizieren
Gesamtrifampicin = 116 mg
Gesamtrifampicin abgegeben mit dieser Methode = 692 mg.

[0113] Unter Verwendung dieses Dosierungsplans wird Rifampicin bis zu 30 Tage lang freigesetzt.

[0114] Diese Dosierung erzeugt keine toxischen oder negativen Wirkungen bei nicht infizierten Primaten. Eine fortgesetzte Behandlung bei Primaten beinhaltet die folgenden Schritte:

1. Injektionsdosierungsplan nach 30 Tagen wiederholen, unter der Annahme, dass die Primaten keine negativen Reaktionen auf den Wirkstoff zeigten. Leberfunktion etc. wird überwacht und Sputumkulturen werden für Tuberkelbazillen abgenommen.
2. Injektion wird alle 30 Tage wiederholt und die Primaten überwacht.
3. Dies wird mindestens 6 Monate lang fortgesetzt.
4. Primaten werden auf Zeichen von Tuberkulose überwacht.

Beispiel 4: Ergebnisse für die intrazelluläre Wirksamkeit von mit Aconiazid beladenen Mikrokügelchen gegen *M. tuberculosis* (Referenz)

[0115] Kleine Mikrokügelchen wurden mit 4 Gew.-% Aconiazid beladen unter Verwendung eines ähnlichen Präparats, wie vorher für Rifampicin beschrieben. Das Präparat war 60:40 DL-PLG mit Ethylacetat als Trägerlösungsmittel. Die J774-Mausmonozytenzelllinie wurde mit *M. tuberculosis* H37Ra infiziert unter Verwendung der vorher beschriebenen Verfahren. Kolonie bildende Einheiten (CFUs) wurden sofort nach Infektion (Zeitpunkt 0) und 7 Tage nach Infektion bestimmt. Versuchsgruppen bestanden aus (1) infizierten Makrophagen, die mit freiem Aconiazid in Konzentrationen von 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,3 µg/ml behandelt worden waren, (2) infizierten Makrophagen, die mit freiem Isoniazid in Konzentrationen von 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,3 µg/ml behandelt worden waren und (3) infizierten Makrophagen, die mit äquivalenten Konzentrationen von Aconiazid behandelt worden waren, mit dem kleine Mikrokügelchen (1 bis 10 µm) beladenen worden waren. MIC für *M. tuberculosis* H37Ra für Isoniazid ist 0,03 µg/ml und für Aconiazid 0,1 µg/ml. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 11A](#) bis [Fig. 11C](#) gezeigt.

Beispiel 5: Kombinationstherapie unter Verwendung von mit Rifampin beladenen Mikrokügelchen und einem oralen Schema für Isoniazid (Referenz)

[0116] *M. tuberculosis* H34Rv wurde verwendet, um Mäuse zu infizieren und die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Der Hauptzweck dieses Versuchs war dreifach. Zuerst sollte ein Bereich an Dosen für Isoniazid etabliert werden, der sowohl wirksame als auch nicht wirksame Ergebnisse enthielt. Dies würde eine bessere statistische Auswertung der kombinierten Therapie mit mit Wirkstoff beladenen Mikrokügelchen zulassen. Zweitens die Auswertung kleiner Präparate von Rifampin, die 5,8 Gew.-% Rifampin enthielten. Drittens, um eine kombinierte Therapie auszuwerten unter Verwendung eines oralen Dosierungsplans von freiem Isoniazid plus mit Rifampin beladenen Mikrokügelchen. Das Versuchsprotokoll ist unten angegeben (Tabelle 8) und die Ergebnisse sind in den Tabellen 9 bis 12 gezeigt.

Tabelle 8

Versuchsprotokoll für die kombinierte Therapie unter Verwendung von Rifamin(RIF)-beladenen kleinen Mikrokügelchen und oraler Dosierungsplan für freies Isoniazid (INH)

Behandlung	Dosierung	Weg	Dosierungsschema	Anzahl d. Mäuse
Unbehandelt	N/A	N/A	N/A	10
Isoniazid (INH)	25 mg/kg	p.o.	Einmal tägl., 0-25 Tage	10
Isoniazid (INH)	12,5 mg/kg	p.o.	Einmal tägl., 0-25 Tage	10
Isoniazid (INH)	6,25 mg/kg	p.o.	Einmal tägl., 0-25 Tage	10
Isoniazid (INH)	3,125 mg/kg	p.o.	Einmal tägl., 0-25 Tage	10
Isoniazid (INH)	1,56 mg/kg	p.o.	Einmal tägl., 0-25 Tage	10
Isoniazid (INH)	0,78 mg/kg	p.o.	Einmal tägl., 0-25 Tage	10
Placebo (Mikrokügelchen)	100 mg	i.p.	Tag 0 & 7	10
5,8 Gew.-% RIF Mikrokügelchen	50 mg	i.p.	Tag 0 & 7	10
5,8 Gew.-% RIF Mikrokügelchen @ 50 mg + INH	12,5 mg/kg	i.p. + p.o.	Tag 0 & 7/ tägl. INH	10
5,8 Gew.-% RIF Mikrokügelchen @ 50 mg + INH	6,25 mg/kg	i.p. + p.o.	Tag 0 & 7/ tägl. INH	10
5,8 Gew.-% RIF Mikrokügelchen @ 50 mg + INH	3,125 mg/kg	i.p. + p.o.	Tag 0 & 7/ tägl. INH	10
5,8 Gew.-% RIF Mikrokügelchen	100 mg			10
5,8 Gew.-% RIF Mikrokügelchen @ 100 mg + INH	12,5 mg/kg	i.p. + p.o.	Tag 0 & 7/ tägl. INH	10
5,8 Gew.-% RIF Mikrokügelchen @ 100 mg + INH	6,25 mg/kg	i.p. + p.o.	Tag 0 & 7/ tägl. INH	10
5,8 Gew.-% RIF Mikrokügelchen @ 100 mg + INH	3,125 mg/kg	i.p. + p.o.	Tag 0 & 7/ tägl. INH	10

Ergebnis der oralen Isoniazidtherapie

[0117] Sowohl bei Lungen als auch Milzen wurde ein Bereich an Wirksamkeit für die orale Isoniazidtherapie erreicht (Tabellen 9 und 10). Im Hinblick auf die Daten für die Lunge (Tabelle 10) waren bei den meisten Platten die Zahlen für Dosen von 15, 12,5 und 6,25 mg/kg 0. Weil zwei oder drei Platten von zehn CFUs zeigten, geben die Zahlen dies jedoch nicht tatsächlich wieder.

Tabelle 9

[0118] Mäuse (10/Gruppe) wurden mit *M. tuberculosis* H37Rv infiziert und mit Isoniazid (INH) behandelt. INH wurde täglich 25 Tage lang in sterilem Wasser oral gegeben. Die Lungen wurden aufgearbeitet und die CFUs 26 Tage nach Infektion bestimmt. Die Daten sind angegeben als $\log_{10}$. Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung (SD) und Wahrscheinlichkeit (P) angegeben, bestimmt mit dem Mann-Whitney-U-Test. Kontrollmäuse erhielten keine Behandlung. Die Dosierungen von INH sind angegeben als mg/kg.

	Unbehandelt	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78
Mittelwert	3,98	0,35 ^a	0,24 ^a	0,52 ^a	0	1,83	3,7
SD	0,06	0,24	0,24	0,35	0	0,32	0,1
P	NA	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0185

^a 2 bis 3 Platten von 10 hatten nachweisbare CFUs, ansonsten wären diese Werte 0.

Tabelle 10

[0119] Mäuse wurden mit *M. tuberculosis* H37Rv infiziert und mit Isoniazid (INH) behandelt. INH wurde täglich 25 Tage lang in sterilem Wasser oral gegeben. Die Milzen wurden verarbeitet und die CFUs 26 Tage nach Infektion bestimmt. Die Daten sind angegeben als log₁₀. Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung (SD) und Wahrscheinlichkeit (P), bestimmt mit dem Mann-Whitney-U-Test, angegeben. Kontrollmäuse erhielten keine Behandlung. Die Dosierungen von INH sind als mg/kg angegeben.

	Unbehandelt	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78
Mittelwert	3,97	0,77	0,70	0,87	1,96	3,16	3,79
SD	0,90	0,19	0,24	0,47	0,41	0,12	0,08
P	NA	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,0002	0,1431

[0120] Die Ergebnisse der Therapie mit kleinen Mikrokügelchen und der kombinierten Therapie aus kleinen Mikrokügelchen und oralem Isoniazid sind in den Tabellen 11 und 12 angegeben. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Mikrokügelchen, die mit 50 mg Rifampin beladen sind (am Tag 0 und 7 gegeben) nicht zu einer signifikanten Reduktion von CFUs in der Lunge (Tabelle 11) oder Milz (Tabelle 12) in dem Zeitraum von 26 Tagen der Untersuchung führte. Die Behandlung mit mit 100 mg Rifampin beladenen Mikrokügelchen (am Tag 0 und 7 gegeben) führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der CFUs am Ende des Versuchszeitraums von 26 Tagen. Obwohl eine signifikante Reduktion von CFUs mit den kombinierten Therapien (Tabelle 11 und 12) erreicht wurde, war es nicht möglich, signifikante Unterschiede zu dem oralen Dosierungsplan mit Isoniazid (Tabellen 9 und 10) zu zeigen, weil signifikante Ergebnisse bereits mit oralem Isoniazid allein erreicht wurden. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass mit der kombinierten Therapie aus Mikrokügelchen + oralem Isoniazid (Tabellen 11 und 12) eine vollständige Eliminierung von CFUs beobachtet wurde (außer für 12,5 bei Lungen, Tabelle 11), wohingegen dies nicht der Fall war, wenn nur der orale Isoniaziddosierungsplan verwendet wurde (Tabellen 9 und 10).

Tabelle 11

[0121] Mäuse wurden mit *M. tuberculosis* H34Rv infiziert, wie oben beschrieben und mit mit Rifampin beladenen Mikrokügelchen allein oder in Kombination mit Isoniazid (INH) behandelt. Eine Gruppe wurde mit 50 mg 5,8 Gew.-% kleinen Mikrokügelchen behandelt, das i.p. am Tag 0 und 7 gegeben wurde (angegeben als 50 mg). Eine weitere Gruppe wurde mit 100 mg 5,8 Gew.-% kleinen Mikrokügelchen behandelt, gegeben i.p. am Tag 0 und 7 (angegeben als 100 mg). INH wurde täglich 25 Tage lang in sterilem Wasser in den folgenden Konzentrationen oral gegeben: 12,5, 6,25 und 3,125 mg/kg. Die Lungen wurden verarbeitet und die CFUs 26 Tage nach Infektion bestimmt. Die Daten sind angegeben als log₁₀. Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung (SD) und Wahrscheinlichkeit (P) bestimmt mit Mann-Whitney-U-Test angegeben. Die Kontrollmäuse erhielten keine Behandlung. Die Dosierungen von INHs sind angegeben als mg/kg.

	Un- be- han- delt	50 mg	50 mg + 12,5	50 mg + 6,25	50 mg + 3,125	100 mg	100 mg + 12,5	100 mg + 6,25	100 mg + 3,125
Mit- tel- wert	3,98	3,76	0,19	0	0	3,05	0	0	0
SD	0,06	0,17	0,19	0	0	0,19	0	0	0
P	NA	0,364	<0,000 1	<0,000 1	<0,00 01	0,0003	<0,000 1	<0,000 1	<0,000 1

Tabelle 12

[0122] Die Parameter sind die gleichen, wie in Tabelle 11, außer dass die Daten CFUs zeigen, die aus der Milz erhalten wurden.

	Un- be- han- delt	50 mg	50 mg + 12,5	50 mg + 6,25	50 mg + 3,125	100 mg	100 mg + 12,5	100 mg + 6,25	100 mg + 3,125
Mit- tel- wert	3,97	3,85	0	0	0	2,25	0,17	0	0
SD	0,09	0,13	0	0	0	0,50	0,17	0	0
P	NA	0,393	<0,000 1	<0,000 1	<0,000 1	0,001 5	<0,000 1	<0,000 1	<0,000 1

[0123] Für die Isoniaziddosis, die nicht zu einer signifikanten Reduktion der CFUs führte (3,125 mg/kg in der Milz, Tabelle 10), war es möglich, diese Ergebnisse statistisch mit der kombinierten Therapie unter Verwendung der kleinen Mikrokügelchen zu vergleichen. Als Ergebnis wurde festgestellt, dass sowohl die 50-mg- als auch 100-mg-Dosis der kleinen Mikrokügelchen (gegeben am Tag 0 und 7) zu einer signifikanten Verbesserung der CFU-Reduktion führte im Vergleich zu einer Therapie nur mit oralem Isoniazid ($P = 0,0021$ sowohl für 50 als auch 100 mg). Für die orale Isoniazidtherapie (3,125 mg/kg, Tabelle 10) wurden $1,96 \log_{10}$ CFUs beobachtet, wohingegen, wenn sie mit 50- oder 100-mg-Mikrokügelchentherapie kombiniert wurde, eine vollständige Eliminierung der CFUs beobachtet wurde. Diese Ergebnisse belegen deutlich den Nutzen der Mikrokügelchen in einer kombinierten Therapie mit anderen antimycobakteriellen Wirkstoffen.

[0124] Schließlich zeigte der Bioassay, dass Rifampinplasmapegel, die durch Rifampinmikrokügelchen entstehen, MIC-Pegel um das 2- bis 4-fache während des Versuchs überschritten und die Empfindlichkeitstests zeigten keine Veränderung der Wirkstoffempfindlichkeit für *M. tuberculosis* H34Rv.

Beispiel 6: Ratten (Referenz)

[0125] Versuche mit Ratten wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob die kleinen Mikrokügelchenpräparate sicher intravenös injiziert werden können (i.v.). Durch Trial-and-Error mit verschiedenen Präparaten mit kleinen Mikrokügelchen (8 Präparate im Bereich von 1,76 bis 5,8 Gew.-% Beladung und Injektionen im Bereich von 1,0 bis 320 mg) wurde festgestellt, dass bis zu 250 mg kleine Mikrokügelchen in 1,0 ml Fluid intravenös injiziert werden können ohne negative Nebenwirkungen. Außerdem lernten wir, dass die Mikrokügelchenpräparate sicherer gemacht werden können, indem vor der Injektion gesiebt wird. Subcutane Injektionen der großen Mikrokügelchen brachten keine Probleme bei den Ratten. Gewebeproben wurden 14 Tage nach Injektion aus Lungen, Milz, Leber, Herz und Nieren von 6 verschiedenen Ratten entnommen, nach i.v.-Injektion der maximalen Dosis (250 mg der kleinen Mikrokügelchen mit 5,8 Gew.-% Rifampin) und aufgearbeitet und mit histopathologischen Standardtechniken und Anfärbungstechniken gefärbt (d.h. H&E). Die Ergebnisse zeigen die

Gegenwart von Mikrokügelchen in den Alveolarkapillarbetten der Lungen, der Leber, Milz, von Herz und Niere. Milde bis mäßige Histiocytose wurde in Leber und Milz bei einer von sechs Ratten beobachtet und bei keiner Ratte wurden Läsionen in den Lungen, Herzen oder Nieren beobachtet.

Beispiel 7: Primaten

[0126] Nach Standardquarantäne wurden drei männliche und drei weibliche Cynomolgusprimaten (*Macaca fascicularis*) statistisch in drei Gruppen von zwei (ein männliches und ein weibliches pro Gruppe) Tieren vor der Untersuchung aufgeteilt.

[0127] Aufbau der Studie: 1) Kleine, mit 5,8 Gew.-% Rifampin beladene Mikrokügelchen wurden auf dem intravenösen Weg (i.v.) verabreicht und 2) große mit 23 Gew.-% Rifampin beladene Mikrokügelchen wurden auf dem subcutanen Weg (s.c.) verabreicht. Ein männliches und ein weibliches Tier erhielten mikroverkapseltes Rifampin auf dem i.v.-Weg nur an den Tagen 0 und 7. Ein männliches und ein weibliches Tier erhielten mikroverkapseltes Rifampin auf dem s.c.-Weg nur am Tag 0. Ein männliches und ein weibliches Tier erhielten mikroverkapseltes Rifampin auf dem i.v.-Weg an den Tagen 0 und 7 und auch auf dem s.c.-Weg am Tag 0. Urinproben wurden täglich nach Behandlung gesammelt und Blutproben wurden alle 48 Stunden genommen. Die Körpergewichte wurden mindestens alle 48 Stunden ausgewertet und die klinische Chemie für Leberenzymanalyse wurde vor der Behandlung, ungefähr zur Halbzeit während des Versuchszeitraums und am Schluss der Studie durchgeführt. Gewebeproben von der Gruppe, die s.c. und i.v. mikroverkapseltes Rifampin erhalten hatte, wurden am Tag 31 für 43 Organe gesammelt. Das Injektionsprotokoll ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13

[0128] Protokoll für die Injektion von mit Rifampin (RIF) beladenen Mikrokügelchenpräparaten bei Primaten. Große RIF-beladene Mikrokügelchenpräparate wurden s.c. nur am Tag 0 injiziert. Kleine mit RIF beladene Mikrokügelchen wurden i.v. an den Tagen 0 und 7 injiziert.

Anzahl d. Primaten	Weg	Größe und Beladung der Mikrokügelchen	Dosierung der Mikrokügelchen (mg/Primat)	Dosis RIF (mg/kg)
2	s.c.	groß, 10-150 µm 23 Gew.-%	2.000 mg (Tag 0)	115 gesamt
2	i.v.	klein, 1-10 µm 5,8 Gew.-%	2.000 mg (Tag 0) + 2.000 mg (Tag 7) = 4.000 mg gesamt	29 + 29 = 58 gesamt
2	i.v. + s.c.	klein, 1-10 µm 5,8 Gew.-% & groß, 10-150 µm 23 Gew.-%	2.000 mg, i.v. (Tag 0) + 2.000 mg, i.v. (Tag 7) + 2.000 mg, s.c. (Tag 0) = 6.000 mg gesamt	29 + 29 + 115 = 173 gesamt

Probennahmen

[0129] Körpergewichte wurden nach jeder Blutentnahme erhalten. Das Serum wurde aseptisch entnommen und in Kryogläschen bei -70°C gefroren aufbewahrt. Die Gerinnsel wurden aufbewahrt. Urin wurde täglich bei allen Tieren gesammelt. 1 ml Urinprobe wurde durch ein 0,2 µm Filter filtriert vor der Aufbewahrung in Kryogläschen bei -70°C. Urinvolumen, Farbe und klinische Beobachtungen der Tiere wurden jeden Morgen aufgezeichnet.

Bioassay

[0130] Serum und Urinproben wurden auf biologisch aktives Rifampin untersucht. Geeignete Kontrollen wurden verwendet, um die Abwesenheit jeglicher hemmenden Substanz in Serum und Urinproben sicherzustellen.

Klinische Beobachtungen

[0131] Keine signifikanten Veränderungen im Körpergewicht wurden während des Versuchs festgestellt. Die

klinische Chemie wurde durchgeführt an Blutproben, die vor der Behandlung und an den Tagen 15 und 31 nach Behandlung entnommen wurden. Die Blutchemie, die Alaninaminotransferase, Aspartataminotransferase und alkalische Phosphatase einschloss, blieb während der Untersuchung im normalen Bereich.

Histopathologie

[0132] Im Großen und Ganzen wurde bei allen Geweben beobachtet, dass sie normal waren. Kleine Mikrokügelchen wurden in mit H&E gefärbten Bereichen von Lunge, Milz, Leber, Niere beobachtet und große Mikrokügelchen wurden in der Haut (von der Injektionsstelle) von beiden Tieren beobachtet. Gewebereaktionen waren mild bis mäßig an der Haut an der Injektionsstelle und schlossen Kapselbildung aus Fasergewebe mit einigen Histiozyten und Fremdkörperriesenzellen ein.

[0133] Histiozytose war mäßig in der Milz mit merklichem Auftreten von Mikrokügelchen in der roten Pulpa. Die gesamte andere Pathologie war normal.

[0134] Die Erfindung ist nicht auf spezifische synthetische Methoden, spezifische pharmazeutische Träger oder spezielle pharmazeutische Formulierungen oder Verabreichungspläne beschränkt, da diese natürlich variieren können. In gleicher Weise dient die hier verwendete Terminologie nur dem Zweck, spezielle Ausführungsformen zu beschreiben und soll nicht beschränkend sein. Es ist für den Fachmann auf diesem Gebiet selbstverständlich, dass verschiedene Modifikationen und Variationen der vorliegenden Erfindung gemacht werden können. Andere Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich für den Fachmann auf diesem Gebiet, wenn die Beschreibung und hier offenbarte Durchführung der Erfindung in Betracht gezogen werden. Die Beschreibung und die Beispiele sind nur erläuternd.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Zusammensetzung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Verhütung einer prokaryotischen intrazellulären Infektion bei einem Wesen, das eine solche Behandlung benötigt, enthaltend (1) ein erstes Präparat für die intravenöse Verabreichung enthaltend eine erste wirksame Menge eines ersten geeigneten Wirkstoffs, der in ersten biologisch kompatiblen Mikrokügelchen enthalten ist, die einen Durchmesser von 1 bis 10 µm haben, wobei die ersten Mikrokügelchen den ersten geeigneten Wirkstoff bei Verabreichung in einer ersten wirksamen Rate freisetzen, und (2) ein zweites Präparat für subkutane oder intramuskuläre Verabreichung enthaltend eine zweite wirksame Menge eines zweiten geeigneten Wirkstoffs, der in zweiten biologisch kompatiblen Mikrokügelchen enthalten ist, die einen Durchmesser von mehr als 10 µm haben, wobei die zweiten Mikrokügelchen den zweiten geeigneten Wirkstoff in einer zweiten wirksamen Rate freisetzen und wobei der erste geeignete Wirkstoff der gleiche oder ein anderer als der zweite geeignete Wirkstoff ist, wodurch die intrazelluläre Infektion behandelt oder verhütet wird.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die ersten biologisch kompatiblen Mikrokügelchen einen Durchmesser von 1 bis 5 µm haben.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die ersten biologisch kompatiblen Mikrokügelchen einen Durchmesser von 5 bis 10 µm haben.

4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die intrazelluläre Infektion in den Makrophagen vorliegt.

5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die intrazelluläre Infektion Tuberkulose ist.

6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die intrazelluläre Infektion mit AIDS in Beziehung steht.

7. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die intrazelluläre Infektion durch *M. avium* verursacht wird.

8. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die intrazelluläre Infektion durch *M. avium* verursacht wird und wobei der erste geeignete Wirkstoff Rifamycin, Clofazimin, Ciprofloxacin, parenterales Amikacin, Sparfloxacin oder eine Kombination davon ist.

9. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der erste geeignete Wirkstoff der gleiche wie der zweite geeignete Wirkstoff ist.

10. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die zweiten geeigneten Mikrokügelchen einen Durchmesser von

weniger als 150 µm haben.

11. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die ersten Mikrokügelchen eine Poly(lactid)- oder Poly(lactid-co-glycolid)-matrix aufweisen.

12. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die zweiten Mikrokügelchen eine Poly(lactid)- oder Poly(lactid-co-glycolid)-Matrix aufweisen.

13. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die ersten Mikrokügelchen eine Poly(anhydrid)- oder Poly(caprolacton)-Matrix aufweisen.

14. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die zweiten Mikrokügelchen eine Poly(anhydrid)- oder Poly(caprolacton)-Matrix aufweisen.

15. Verwendung nach Anspruch 1, die weiter beinhaltet, dass ein nicht verkapselter Wirkstoff verabreicht wird.

16. Verwendung nach Anspruch 1, die weiter beinhaltet, dass ein nicht verkapselter Wirkstoff oral verabreicht wird.

17. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die prokaryotische intrazelluläre Infektion Tuberkulose ist.

18. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 17, wobei das Wesen ein Mensch ist.

19. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der erste geeignete Wirkstoff von dem zweiten geeigneten Wirkstoff verschieden ist.

20. Verwendung nach Anspruch 17, wobei ein geeigneter Wirkstoff Rifampicin oder Rifabutin ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

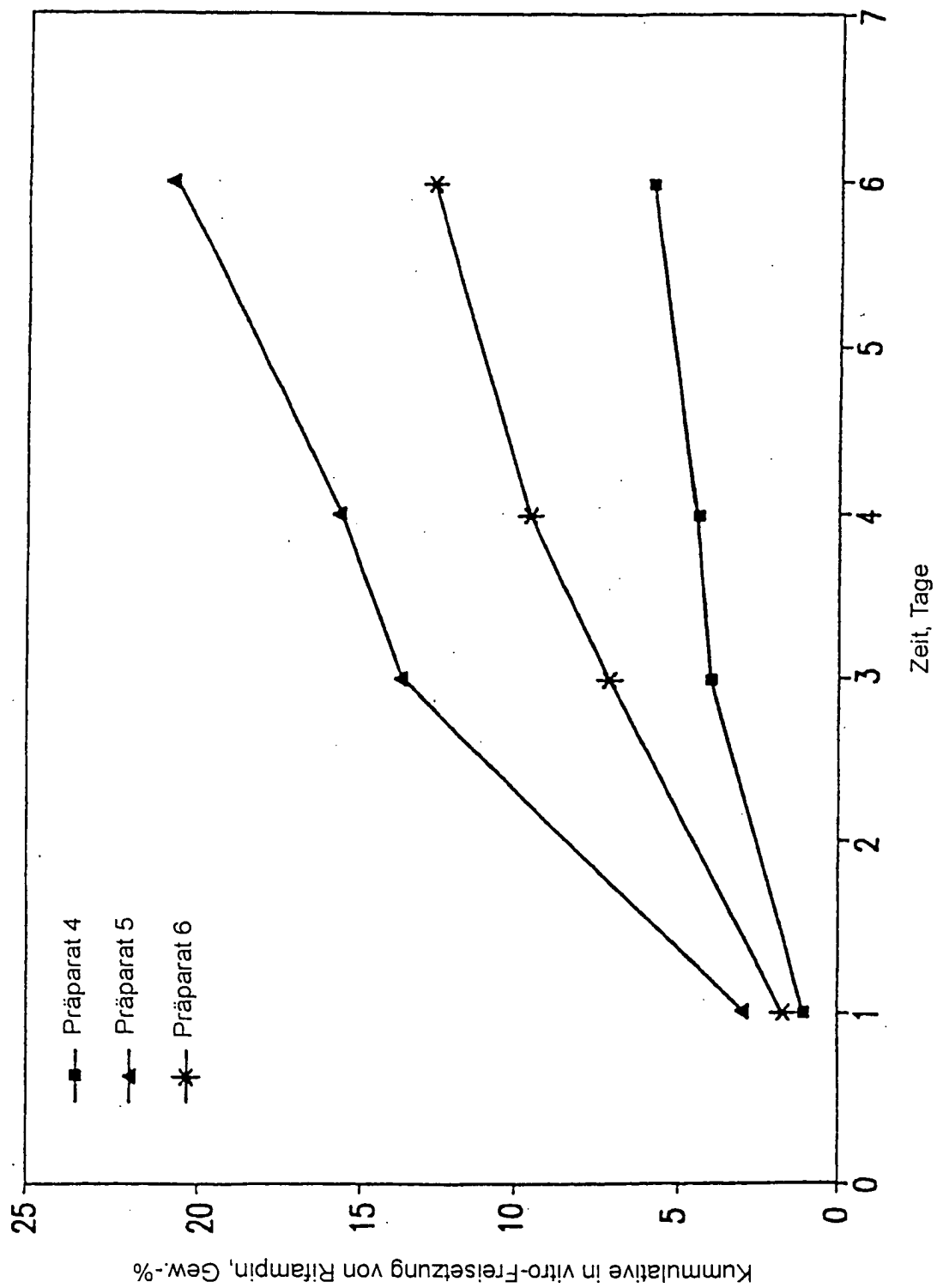


FIG.1

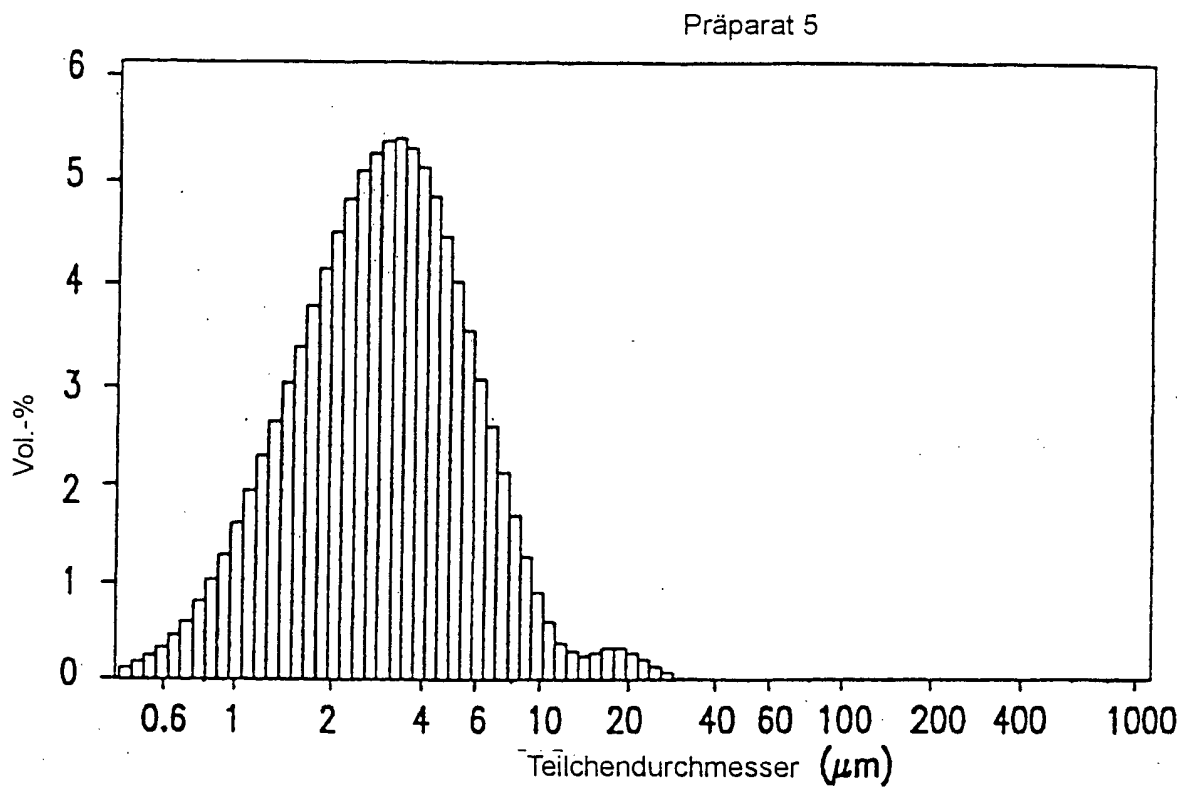


FIG.2A

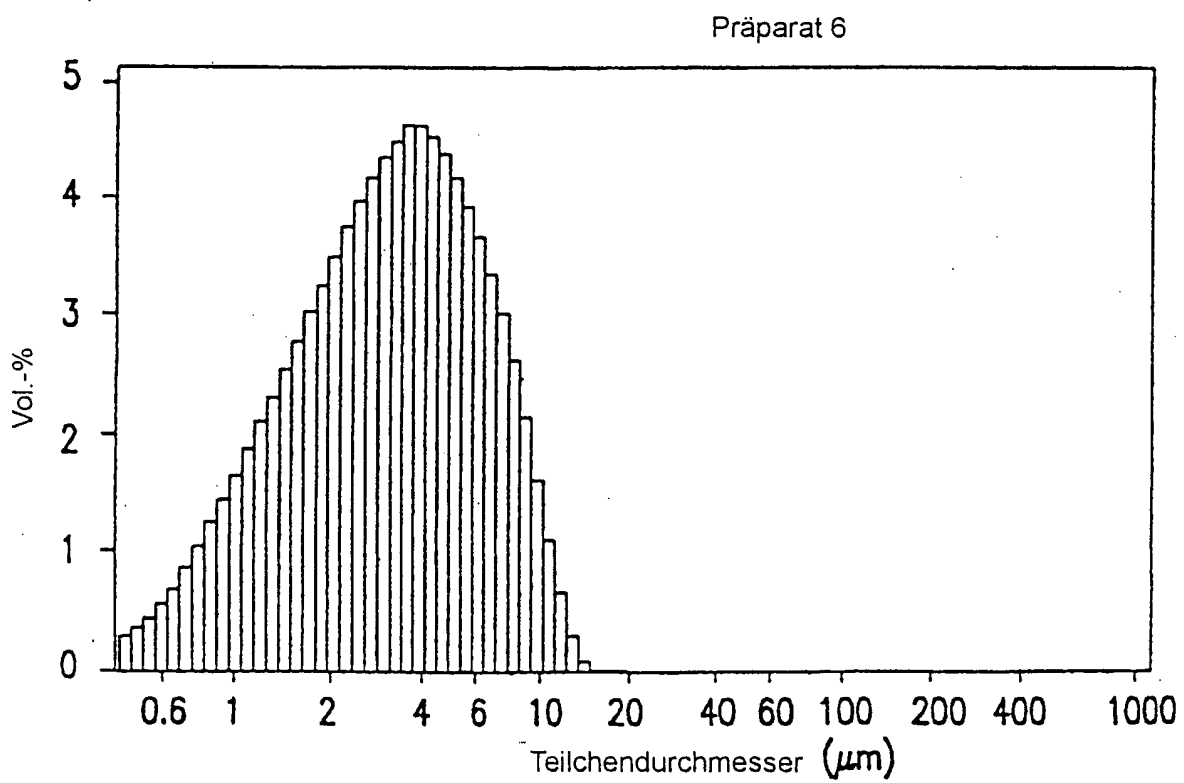


FIG.2B

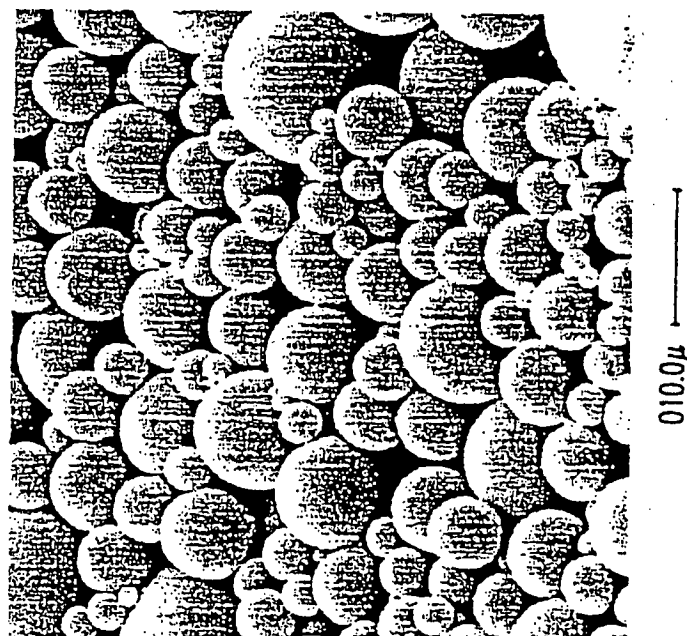


FIG.3B

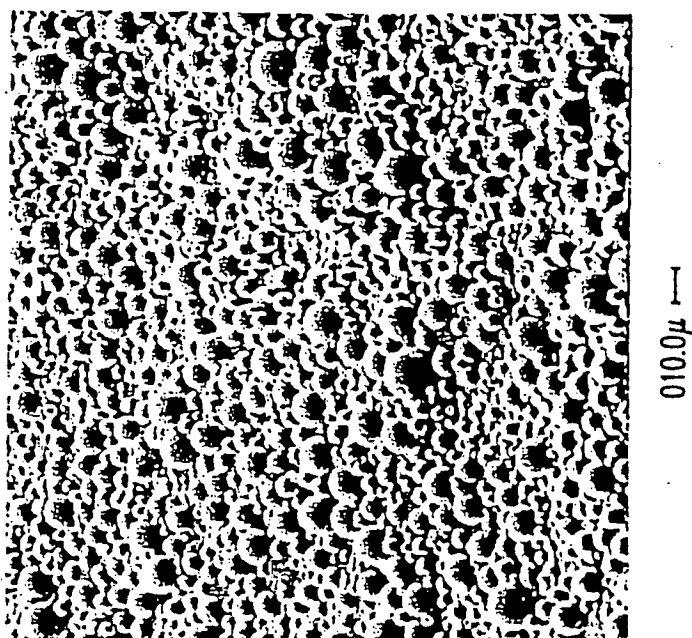


FIG.3A

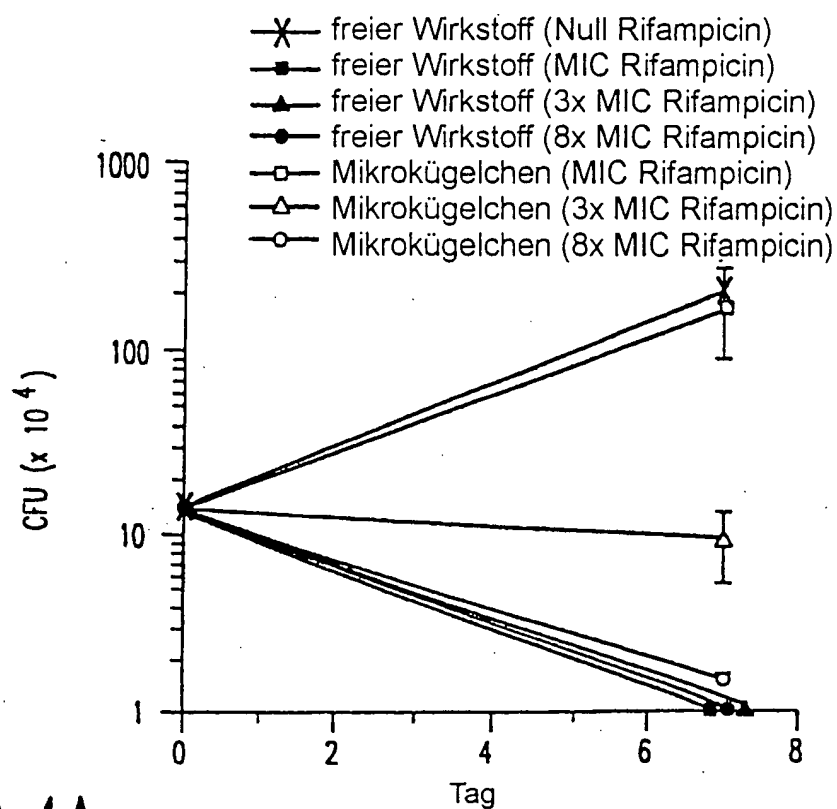


FIG.4A

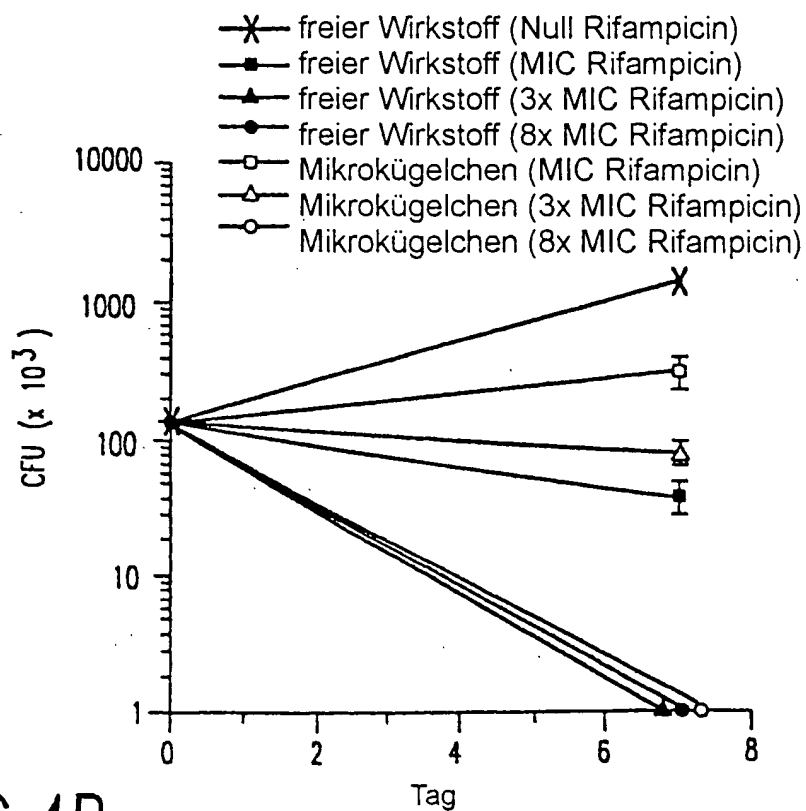


FIG.4B

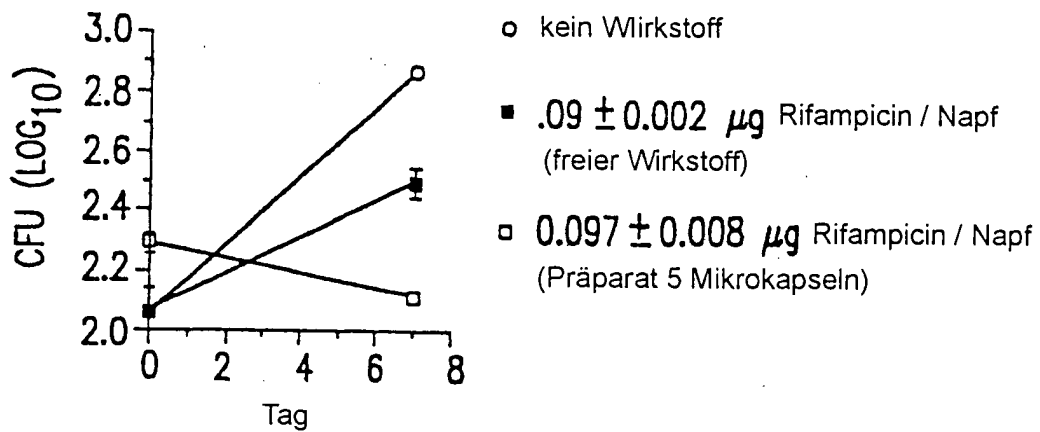


FIG.5A

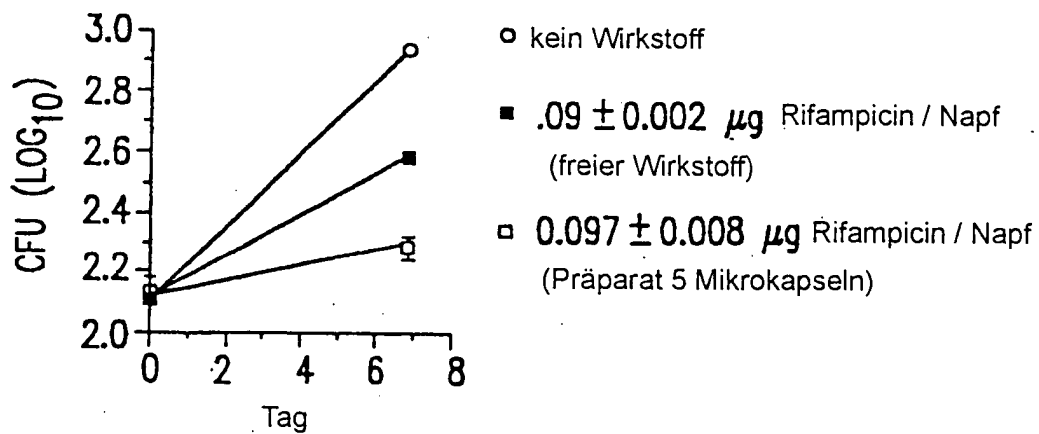


FIG.5B

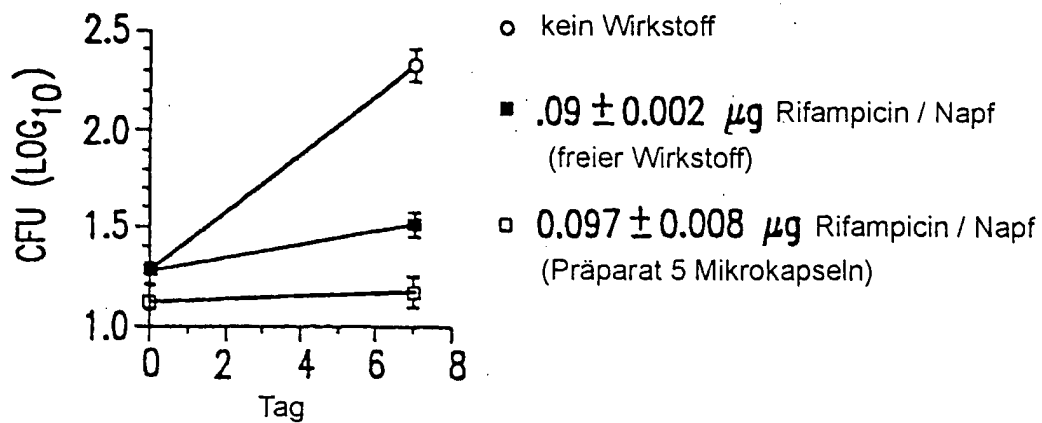


FIG.5C

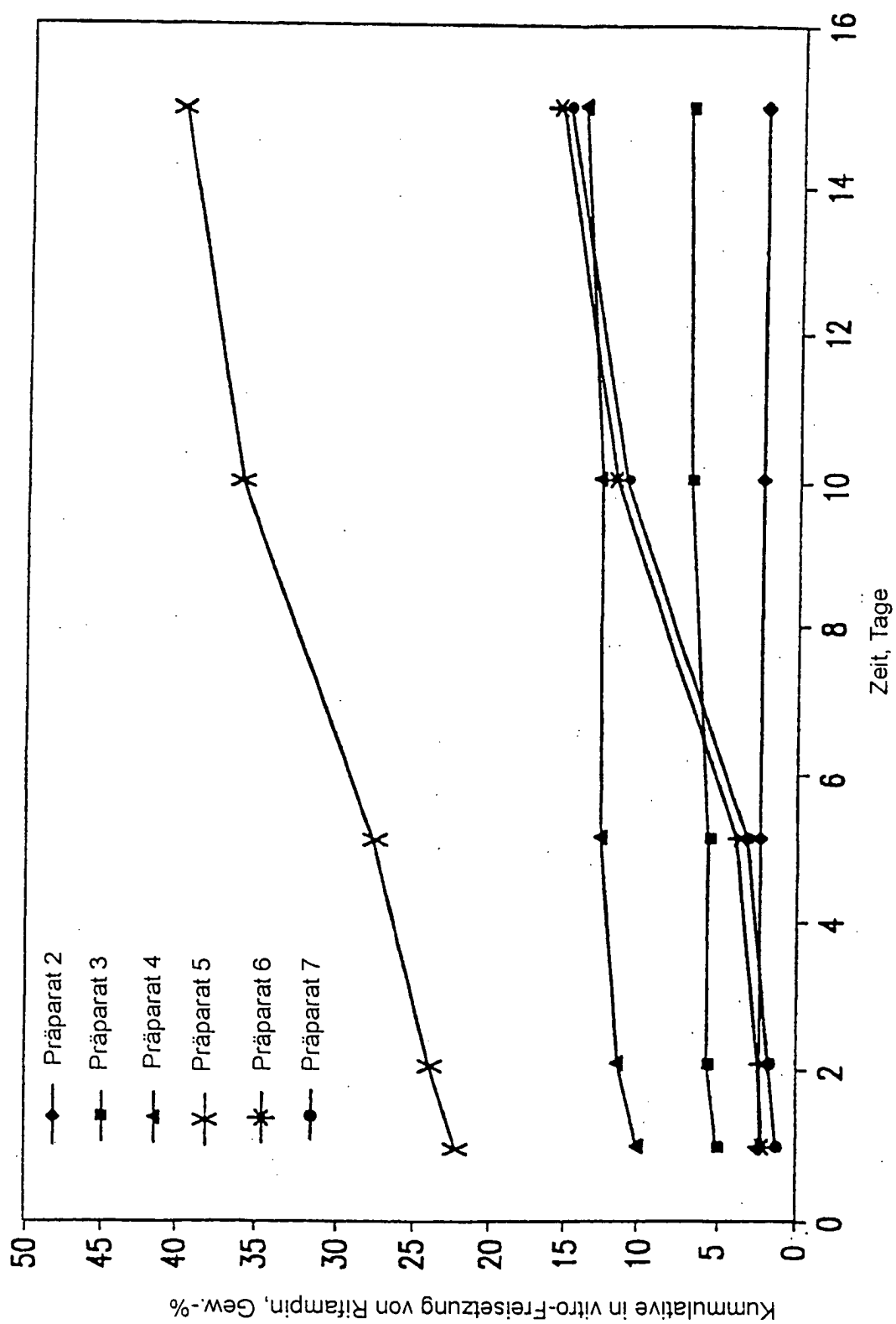
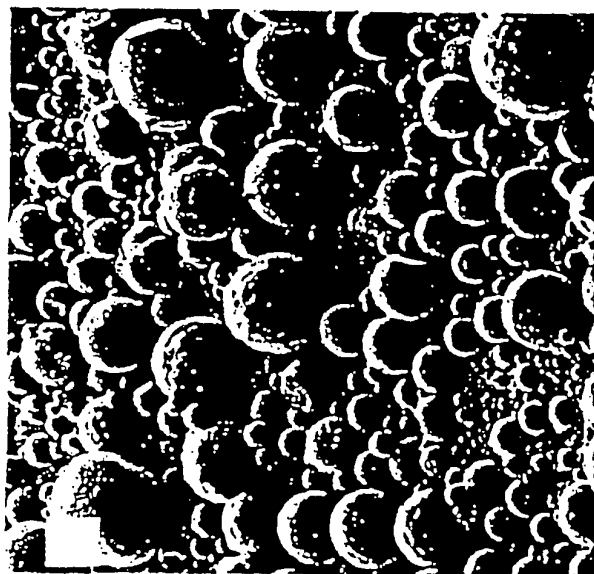
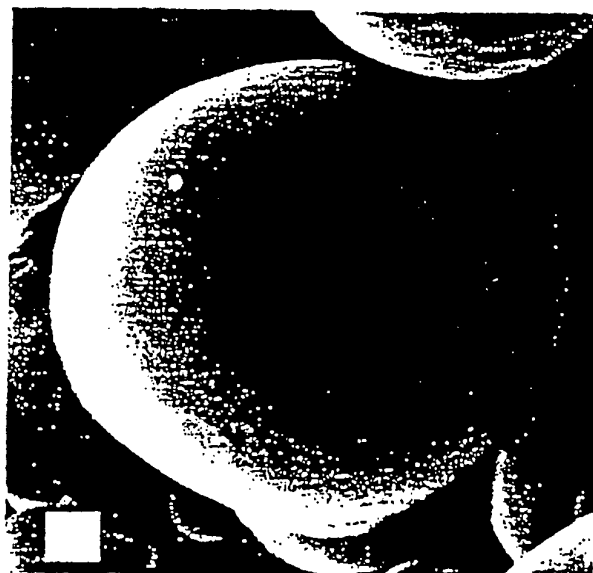


FIG.6



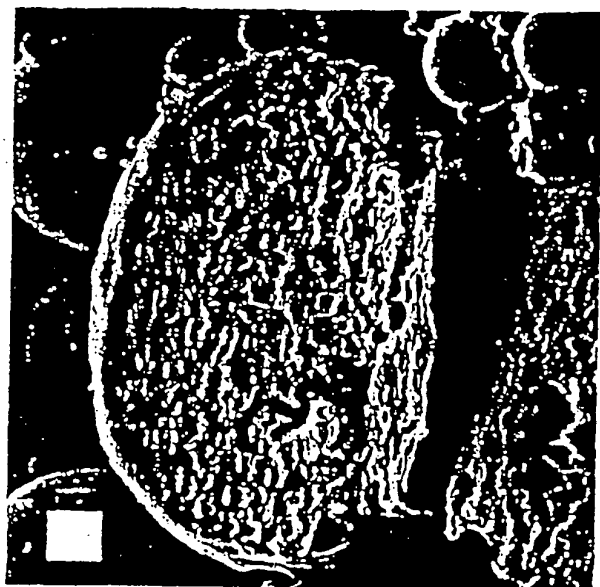
100.0 μm

FIG. 7A



100.0 μm

FIG. 7B



100.0 μm

FIG. 7C

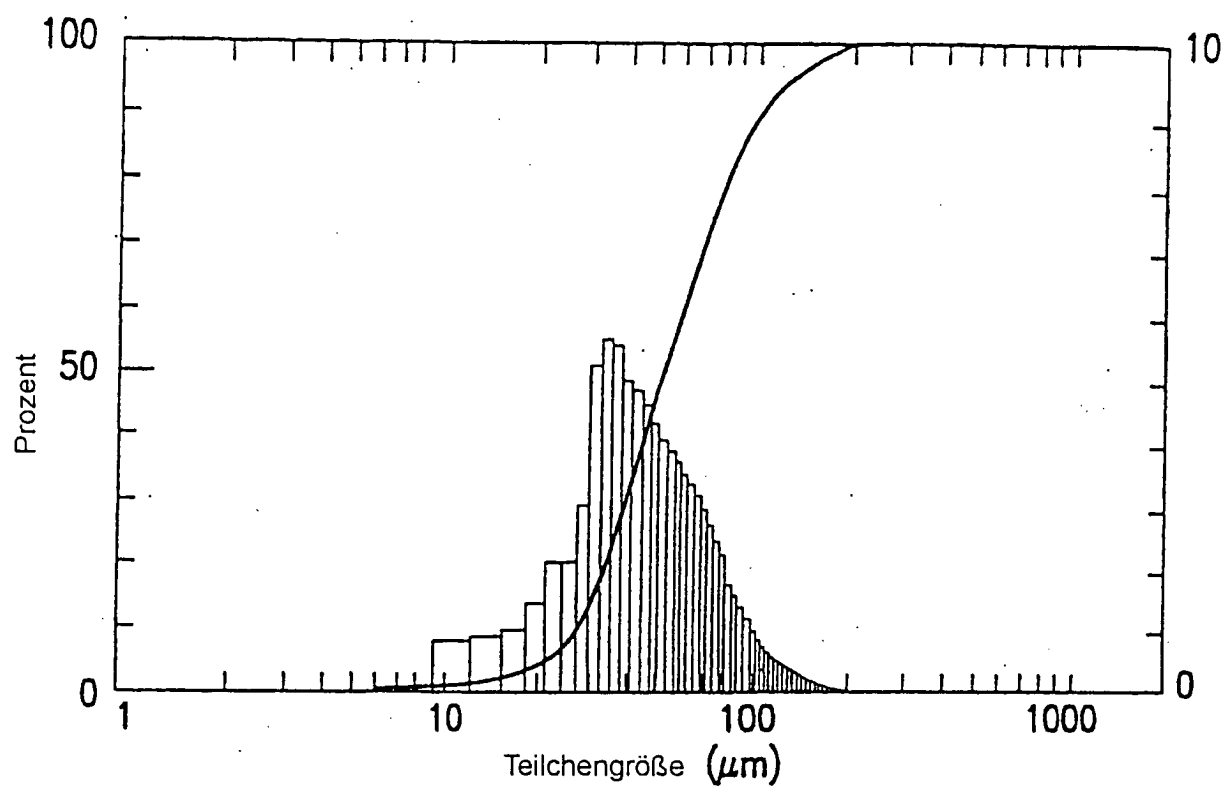


FIG.8A

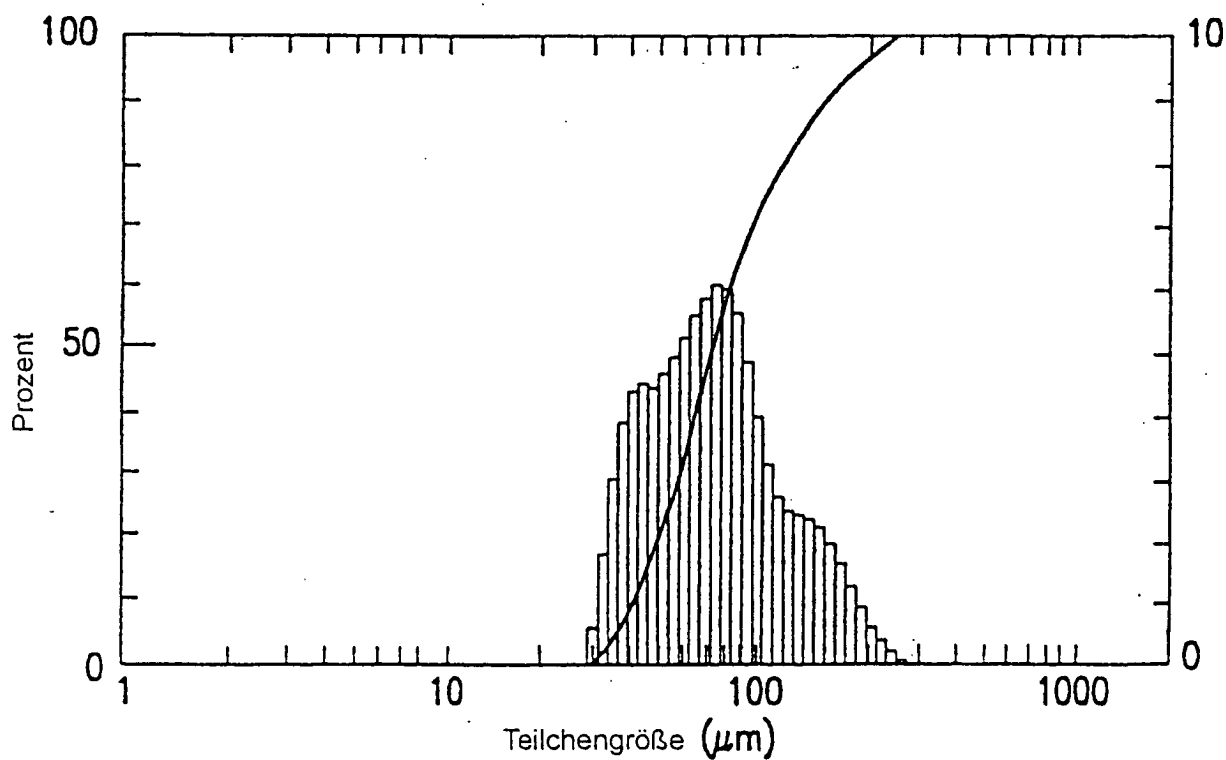


FIG.8B

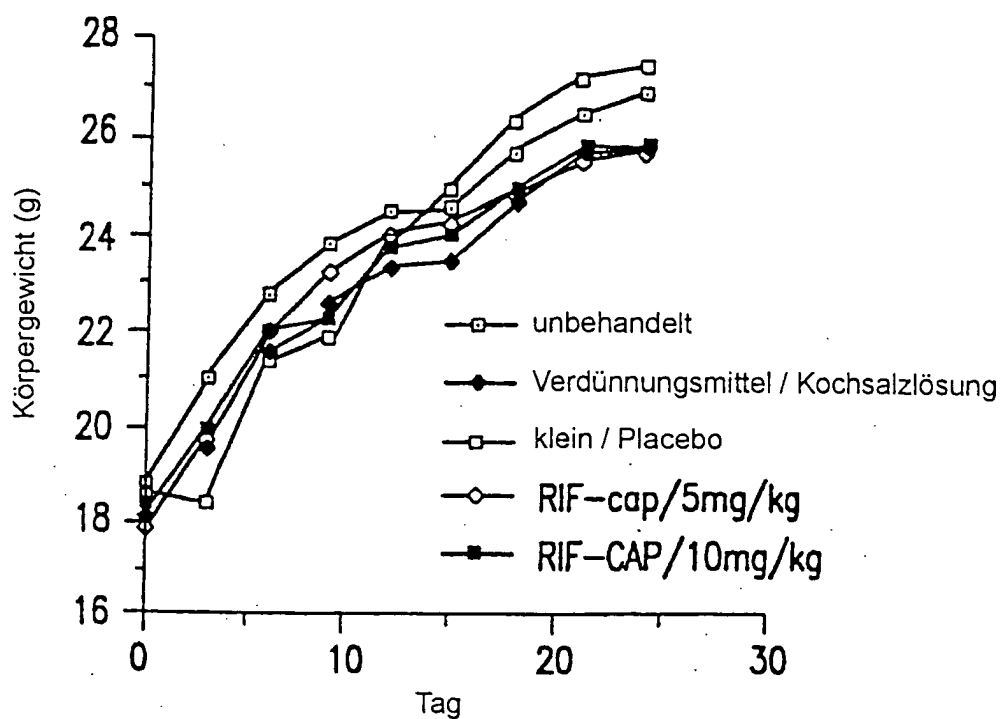


FIG.9A

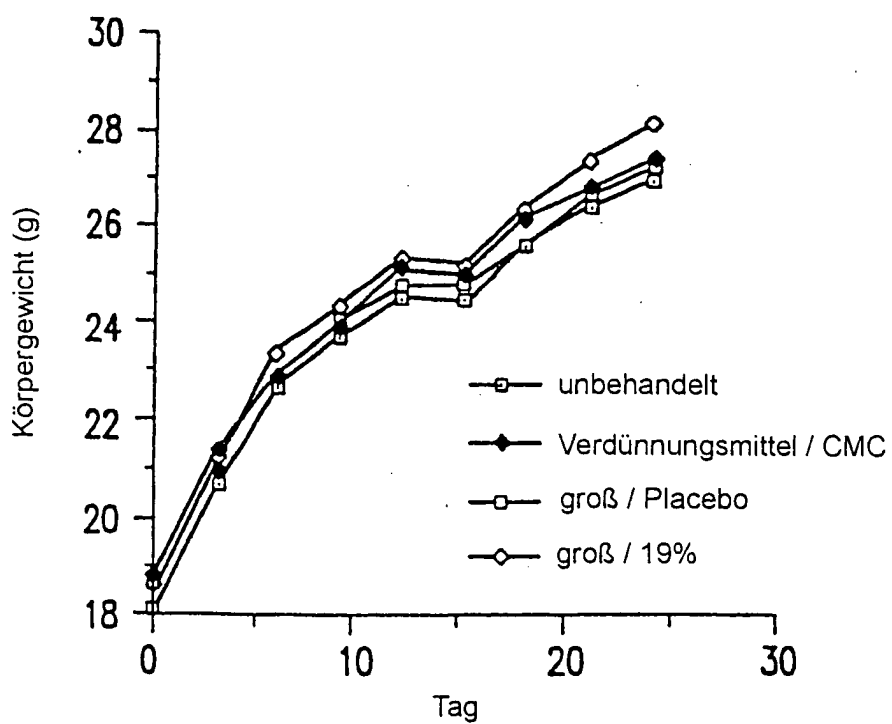


FIG.9B

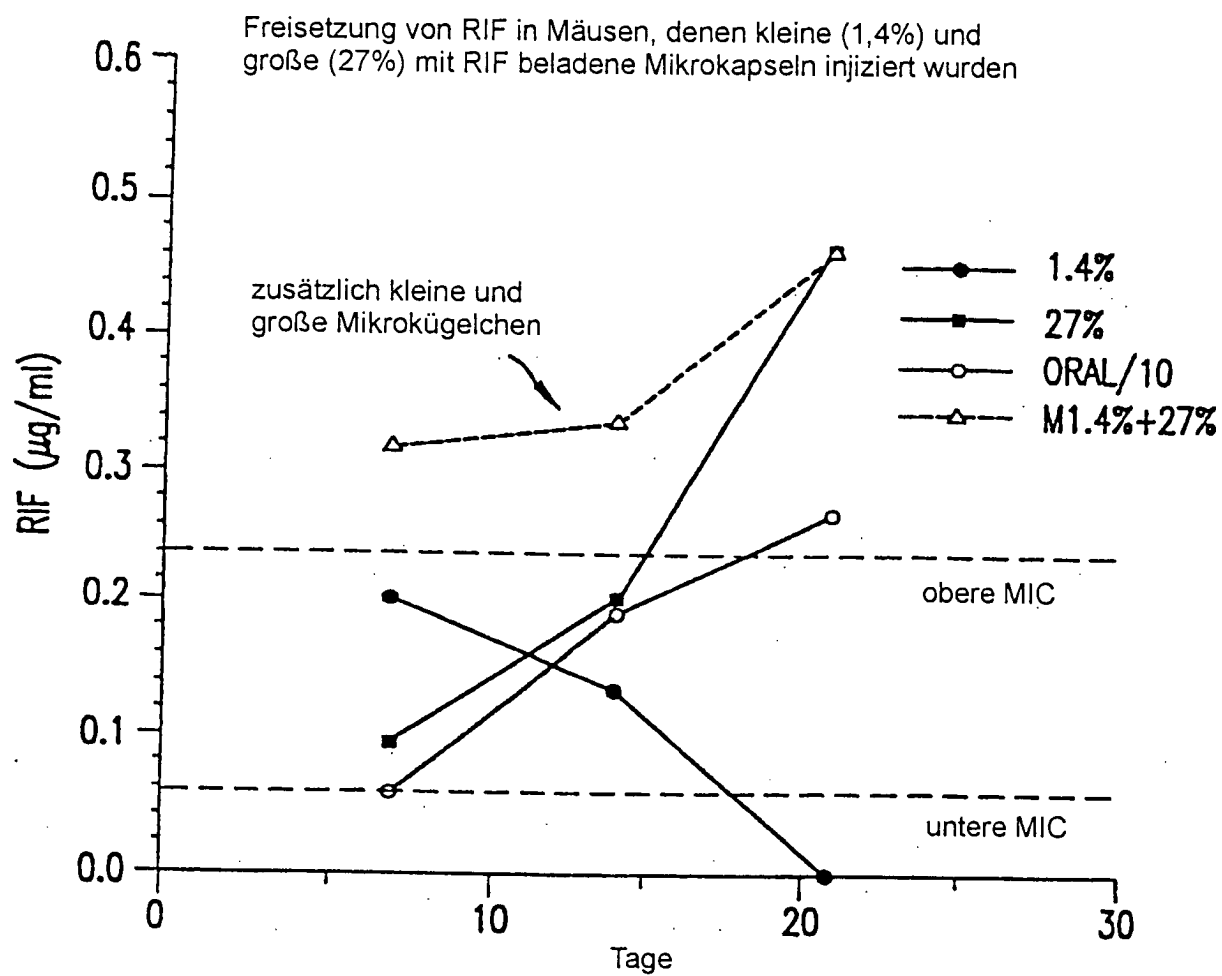


FIG.10

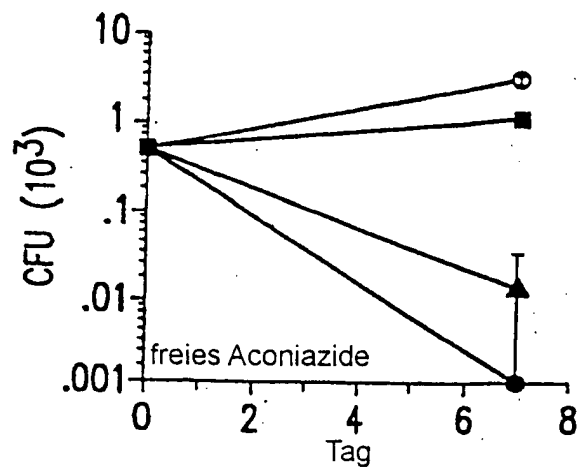


FIG. 11A

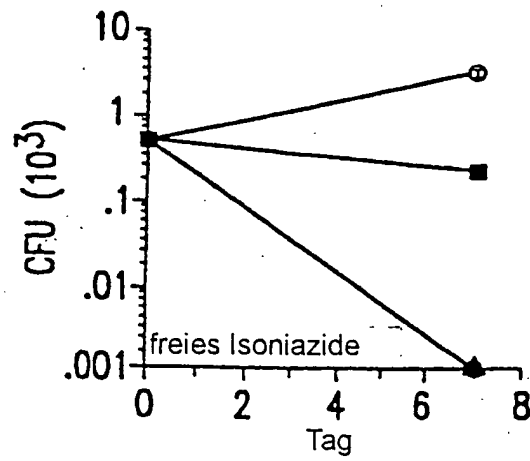


FIG. 11B

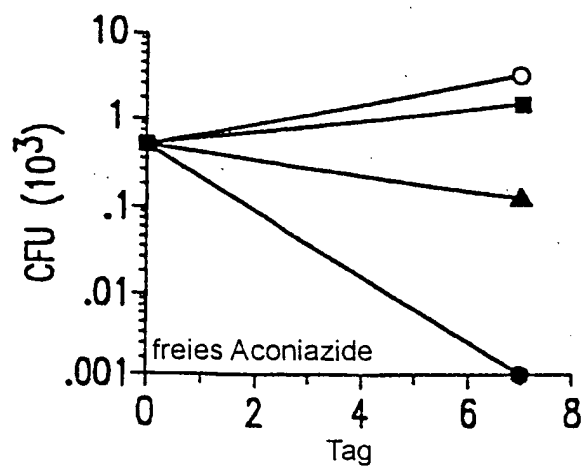


FIG. 11C