



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 34 495 T2** 2006.09.07

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 007 000 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 34 495.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB98/00817**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 910 875.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/041188**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **24.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **10.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.09.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 9/10** (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

C12N 11/04 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9705588 18.03.1997 GB

(73) Patentinhaber:

**Quadrant Drug Delivery Ltd., Ruddington,
Nottingham, GB**

(74) Vertreter:

Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

KAMPINGA, Jaap, 9731 MJ Groningen, NL

(54) Bezeichnung: **STABILISIERTE PARTIKEL IN FLÜSSIGEN FORMULIERUNGEN**

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] Alle lebenden Organismen erfordern Wasser. In der Tat sind die meisten Lebewesen zu einem großen Ausmaß Wasser. Eines der wenigen vereinheitlichenden Themen in der Biologie ist, dass Wasser etwa 75 % des Gewichts eines Organismus ausmacht. Jedoch gibt es bemerkenswerterweise eine Anzahl von Lebewesen, die in trockenem Zustand nach Verlust nahezu ihres ganzen Wassers überleben können. Diese Fähigkeit, als Anhydrobiose ("Leben ohne Wasser") bezeichnet, wird in allen biologischen Reichen gefunden, einschließlich Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen, und entwickelte sich wahrscheinlich mindestens vor zwei Milliarden Jahren. Derartige anhydrobiotische Organismen sind in der Lage, vollkommen auszutrocknen und offensichtlich zu sterben, jedoch sind sie nicht tot; sie überleben inaktiv und leblos über unbestimmte Zeiträume in einem Zustand des unterbrochenen Belebtheins, bis sie durch die Anwesenheit von Wasser ins Leben zurückgebracht werden. Alle diese lebendigen Dinge haben das Problem gelöst, biologische Moleküle ohne Kühlung oder Einfrieren zu konservieren.

[0002] Ein klar definiertes Merkmal, das anhydrobiotischen Organismen gemeinsam ist und das wahrscheinlich für ihre Austrocknungstoleranz kritisch ist, ist ihre Fähigkeit, große Mengen eines einfachen Zuckers herzustellen. Der wirksamste ist Trehalose (α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranosid), aber die anhydrobiotische Pflanze *Craterostigma plantagineum* akkumuliert zum Beispiel Saccharose anstelle von Trehalose. Es ist klar, dass intrazelluläre und extrazelluläre Zucker für die Lebensfähigkeit von getrockneten Zellen oder Organismen erforderlich sind. Dass Trehalose allein ausreichend für eine Anhydrobiose sein kann, wird durch Arbeiten bestätigt, in denen das Disaccharid künstlich in lebende Zellen eingeführt worden ist, was ermöglichte, dass sie erfolgreich getrocknet und rehydratisiert wurden.

[0003] Trehalose leitet seine Stabilisierungsfähigkeit aus einer Kombination von mehreren Eigenschaften ab. Wie viele andere Zucker kann es Strukturwasser durch Wasserstoffbrückenbindung mit Moleküloberflächen ersetzen. Trehalose ist inert und kann in trockenem Zustand nicht mit anderen Molekülen reagieren. Gewisse andere Analoga sind ebenfalls stabil und inert, aber die meisten Zucker reagieren mit Aminogruppen (die sogenannte Maillard-Reaktion) bei Temperaturen über dem Gefrierpunkt und zerstören das Produkt. Wenn Moleküle unter Verwendung des korrekten Verfahrens aus einer Zuckerlösung getrocknet werden, wird ein Glas gebildet, in das die Moleküle eingebettet werden, was die molekulare Diffusion und jeden damit verbundenen Abbau minimiert.

[0004] Viele Zuckerlösungen können sich beim Trocknen auf zwei sehr verschiedene Weisen verhalten. Das üblichste Verhalten ist, dass der Zucker kristallisiert. Moleküle in Lösung mit dem Zucker werden nicht geschützt, wenn dies stattfindet, da sie aus dem Kristall ausgeschlossen werden. Das alternative Verhalten ist, dass die Lösung fortschreitend konzentrierter wird, bis sie so viskos ist, dass sie bei Raumtemperatur ein festes Glas bildet. Wenn dies passiert, ist das biomolekulare Produkt eine glatte Änderung vom Vorliegen in flüssiger Lösung zu Beginn zum Vorliegen in fester Lösung im Glas am Ende eingegangen. In diesem Zustand kann man sich die Moleküle des Produkts als in der Glasmatrix eingebettet und fest immobilisiert vorstellen. Dies ist analog zu den alten Insekten, die in einem perfekten Konservierungszustand in fossilem Bernstein eingebettet gefunden werden.

[0005] Da Zuckerglas wasserlöslich ist, wird der Prozess leicht in Wasser umgekehrt, so dass das Produkt glatt in seinen nativen Zustand in flüssiger Lösung zurückkehrt. Diese glatten Übergänge stellen sicher, dass während des Trocknens kein Produktschaden auftritt. Was das Produkt betrifft, ist der Übergang von flüssiger Lösung zu fester Lösung nicht wahrnehmbar. Da Gläser der besten Zucker inert sind und einen hohen Schmelzpunkt aufweisen, wenn sie trocken sind, wird das Produkt auch bei der Lagerung geschützt, selbst unter feindlichen Bedingungen.

[0006] Parenteral verabreichte Arzneistoffe werden herkömmlich durch eine hohle Metallnadel als Lösung in Puffer-Salze enthaltendem Wasser injiziert. Die Injektionen können intradermal, subkutan, intramuskulär oder intravenös sein. Seltener kann ein anderer Weg, wie intrathekal oder intraokulär, geeignet sein. Arzneistoffe werden seit über hundert Jahren auf diese traditionelle Weise verabreicht, und trotz der Angst, der Schmerzen und des Infektionsrisikos, die mit Injektionen verbunden sind, gab es keine größere, allgemein akzeptierte Verbesserung des Prozesses in dieser Zeit.

[0007] Der Flüssigstrahl-Injektor, der durch Ausstoßen eines sehr dünnen Flüssigkeitsstroms unter sehr hohem Druck direkt durch die Haut arbeitet, erzielte etwas Erfolg in Impfprogrammen, aber frühe Modelle waren unzuverlässig. Jüngere Entwicklungen, wie die Mediject- und Bioject-Vorrichtung, haben bei Diabetes signifikante Nischen-Anwendungen gefunden und werden auf andere Bereiche erstreckt. Jedoch ist der Spritzen-

und Nadel- und der Strahl-Injektor-Technik einen Hauptnachteil der derzeitigen Technologie gemeinsam. Viele parenterale Arzneistoffe sind in wässriger Lösung instabil und werden als stabilerer gefriergetrockneter Kuchen oder als Pulver hergestellt und gelagert, der bzw. das unmittelbar vor der Injektion eine Rekonstitution mit Wasser oder Puffer erfordert. Dieser Zusatzschritt erfordert ein Training in der Technik und fügt Risiken in Form einer ungenauen Abfüllung von Lösungsmittel und deshalb der Dosierung oder der Einführung einer Infektion durch eine nicht-sterile Technik hinzu. Arzneistoffe, die als Lösung oder als Suspension (wie Insulin) gelagert werden, erfordern eine Kühlung, um einen Abbau zu verhindern, und weisen eine begrenzte Haltbarkeit auf.

[0008] Die Rekonstitution von trockenen Arzneistoffen muss korrekt und präzise vorgenommen werden, um die korrekte Dosierung sicherzustellen, und alle Fehler in diesem Schritt können gefährlich, bei hochpotenten Arzneistoffen sogar tödlich sein. Häufig ist es erforderlich, mehr als einen Arzneistoff zu einem Zeitpunkt zu verabreichen. Dies kann mehrere schmerzhaftes Injektionen erfordern, weil gewisse Arzneistoffe nicht in einer Spritze gemischt werden können, da es chemische Inkompatibilitäten zwischen den Molekülen in Lösung gibt, was zu einem Verlust oder selbst der Erzeugung von toxischen Reaktionsprodukten führt.

[0009] Die optimale Lösung für diese Probleme, die seit langem ein Ziel der Arzneistoffformulierungs-Wissenschaftler ist, ist eine stabile flüssige Formulierung, die vor der Injektion keine Rekonstitution mit Lösungsmittel erfordert. Obwohl einige kleinere Verbesserungen bei der Stabilität wässriger Lösungen erzielt wurden, sorgen sie nicht für die sehr hohen Grade an Arzneistoffstabilität, die mit modernen trockenen Formulierungen unter Verwendung von Trehalose und ähnlichen stabilisierenden Hilfsstoffen erhalten werden können. Jedoch erfordern diese letztgenannten Präparate, obwohl sie selbst unter sehr feindlichen Umgebungsbedingungen äußerst stabil sind, immer noch eine Rekonstitution vor der Injektion. Sie sind auch nur stabil, solange sie sehr trocken sind. Die Aufnahme von Feuchtigkeit selbst in geringen Mengen kann diese trockenen Präparate bei der Lagerung instabil machen. Sie werden gewöhnlich als Zweiphasen-Systeme gelagert, in denen der Arzneistoff in der diskontinuierlichen festen Phase vorliegt und die kontinuierliche fluide Phase trockene Luft, häufig unter verringertem Druck, oder trockener Stickstoff in einem verschlossenen Glasgefäß ist.

[0010] Von den zwei Hauptproblemen bei existierenden Impfstoffen für die Strahl-Injektion, die Instabilität bei der Lagerung und das Erfordernis, getrocknete Impfstoffe zu rekonstituieren, wird das erstgenannte durch ein Trocknungsverfahren, das nun von Quadrant Holdings Cambridge Ltd. patentiert ist, unter Verwendung des einfachen Zuckers Trehalose gelöst. Trehalose-getrocknete Impfstoffe können bei Umgebungstemperaturen von mindestens 45°C ohne nachweisbare Verschlechterung gelagert werden. Am bemerkenswertesten werden selbst Aluminiumhydroxid-Adjuvansgele durch Trehalose während der Trocknung und Lagerung stabilisiert und gewinnen ihr voll hydratisiertes Volumen und ihre Funktion ohne Verklumpen oder Fällung zurück.

[0011] Obwohl das Instabilitätsproblem durch dieses Trocknungsverfahren angesprochen wird, lagen die vorstehend beschriebenen Trehalose-getrockneten Impfstoffe in Form eines festen Glasschaums vor und erforderten vor der Injektion mittels der herkömmlichen Nadel- und Spritzen-Technik eine Rekonstitution (zum Beispiel mit sterilem Wasser oder Puffer-Lösung). Trockene Impfstoffe können in Pulverform formuliert werden und können unter Verwendung von Überschall-Schockwellen aus Gas durch die Haut zugeführt werden. Wegen der Beschränkungen der Gasgeschwindigkeit und dementsprechend des Penetrationsvermögens gibt es gewisse Zweifel, ob tiefe intramuskuläre Injektionen durch diese Mittel erzielt werden können. Eine nützlichere Formulierung wäre eine gebrauchsfertige stabile Flüssigkeit, welche nicht den Transport von getrennten Puffer-Lösungen oder eine Rekonstitution vor Ort erfordert, welche jedoch immer noch die außerordentliche Stabilität von Trehalose-getrocknetem Material aufweisen würde. Ein derartiger Impfstoff könnte in Mehrfachdosen-Behältern formuliert und bequem in Massenimmunisierungskampagnen durch Standard-Strahl-Injektoren zugeführt werden. Wir beschreiben nun eine Entwicklung unter Verwendung von feinen Pulvern und nicht-wässrigen Vehikeln, in denen die Pulver glatt als stabile monodisperse Suspension verteilt werden können.

[0012] Auf der Grundlage des Phänomens der Anhydrobiose haben wir Verarbeitungsbedingungen ersonnen und validiert, welche die Bildung von stabilen Gläsern sicherstellen, die vollständig das anhydrobiotische Phänomen nachahmen. Sie können für die Stabilisierung und Konservierung der meisten Arten von Molekülen und biologischen Systemen verwendet werden, einschließlich vieler Impfstoffe, ohne eine Gefrier Trocknung oder Kühlung zu erfordern.

[0013] Wir beschreiben nun ein Verfahren, das für die Formulierung von selbst den instabilsten Arzneistoffen in einer Flüssigkeitsformulierung verwendet werden kann, die so stabil ist wie die besten Trehalose-getrockneten Formulierungen, aber alle Sicherheit und Bequemlichkeit von gebrauchsfertigen flüssigen Präparaten auf-

weist.

[0014] Ein Arzneistoff kann als feines Pulver unter Bedingungen, die seine optimale Stabilisierung sicherstellen, in Trehalose oder einem anderen stabilisierenden Hilfsstoff im Glaszustand getrocknet werden. Andere Zucker, die spontan gute stabilisierende Gläser bilden, sind Palatinit (eine Mischung von Glucopyranosylsorbit und Glycopyranosylmannit, hergestellt durch Reduktion von Palatinose (Isomaltulose) mit Wasserstoff und Raney-Nickel-Katalysator: produziert von Südzucker AG in Deutschland). Die reinen Isomere Glucopyranosylsorbit und Glucopyranosylmannit sind auch gut, ebenso wie Lactit (das reduzierte Produkt von Lactose oder Milchsucker). (Literatur: (i) Colaco C.A.L.S., Smith C.J.S., Sen S., Roser D.H., Newman Y., Ring S. und Roser B.J., Chemistry of protein stabilisation by trehalose, in "Formulation and delivery of proteins and peptides", Cleland und Langer, Hg., American Chemical Society, Washington, 222–240 (1994); (ii) PCT-Anmeldung Nr. WO 91/18091 "Stabilisation of biological macromolecular substances and other organic compounds". Roser B.J. und Colaco C.; (iii) US-Patent Nr. 5,621,094 "Method of Preserving Agarose Gel Structure During Dehydration by Adding a Non-reducing Glycoside of a Straight Chain Sugar Alcohol" Roser B. und Colaco C.; (iv) PCT-Anmeldung Nr. WO 96/05809 "Improved method for stabilisation of biological substances during drying and subsequent storage and compositions thereof" Colaco C., Roser B.J. und Sen S.).

[0015] Wir haben auch gefunden, dass eine ganze Klasse von Monosaccharidalkoholen, von denen im Stand der Technik angegeben wurde, dass sie als glasbildende Hilfsstoffe unbrauchbar sind, in der Tat ausgezeichnete stabile Formulierungen bilden können, wenn sie korrekt formuliert sind. Diese umfassen Mannit und Inosit.

[0016] Die Bildung von trockenen Glaspulvern, die stabilisierte Wirkstoffe enthalten, kann unter Verwendung jedes geeigneten Zuckers oder Zucker-Derivats aus diesen Gruppen bewerkstelligt werden. Dies kann durch direktes Sprühtrocknen oder durch irgendeinen anderen Trocknungsprozess erzielt werden, einschließlich Standardprozessen wie Vakuum- oder Gefriertrocknung, gefolgt von einem Mahlschritt, wie Strahlmahlen, um die getrocknete Formulierung zu einem feinen Pulver zu zerkleinern. Dieses feine Pulver aus Zuckerglas (diskontinuierliche Phase), welches den Arzneistoff in einer stabilen festen Lösung in dem Glas enthält, wird dann als Suspension in einem Zweiphasen-System formuliert, das als kontinuierliche Phase eine biokompatible nicht-wässrige Flüssigkeit enthält, in der der Zucker unlöslich ist. Der Ausschluss von Wasser aus diesem System konserviert die stabilisierende Wirkung der Trehalose oder des anderen verwendeten stabilisierenden Hilfsstoffs. Wir haben früher mitgeteilt, dass Trehalose-getrocknete Wirkstoffe mehrere Tage in nicht-wässrigen Flüssigkeiten stabil bleiben, in denen die Trehalose selbst unlöslich ist. Gribbon E.M., Sen S., Roser B.J. und Kampinga J. Stabilisation of Vaccines Using Trehalose (Q-T4) Technology. In F. Brown (Hg.) New Approaches to Stabilisation of Vaccine Potency Dev Biol Stand, Karger, Basel 87, 193–199 (1996). Vorausgesetzt, dass das nicht-wässrige Vehikel stabil ist, und vorausgesetzt, dass das Präparat nicht signifikante Wassermengen absorbiert, scheint es wahrscheinlich, dass derartige Formulierungen so unbegrenzt stabil wie das Trehalose-getrocknete Material selbst wären. Während Experimente unter Verwendung nicht-wässriger Labor-Lösungsmittel wie Aceton oder Dichlormethan das Prinzip der Stabilität von aktiven Molekülen in suspendierten Zuckerglas-Mikrokügelchen aufstellen, sind derartige Präparate natürlich nicht injizierbar, weil das Vehikel toxisch ist. Es gibt jedoch verschiedene nicht-wässrige Vehikel, die von den Zulassungsbehörden für eine parenterale Injektion zugelassen sind und die eine Sicherheit und Zweckmäßigkeit demonstrieren haben. Die flüssige Phase kann irgendein injizierbares hydrophobes Lösungsmittel sein, wie ein injizierbares Sesam-, Erdnuss- oder Sojaöl, Ethyloleat oder ein mit Wasser mischbares nicht-wässriges Lösungsmittel, wie Polyethylenglycol. Da die meisten der geeigneten nichtwässrigen Flüssigkeiten selbst bei Raum- oder erhöhten Temperaturen sehr stabil sind und keine Kühlung erfordern, ist das resultierende Zweiphasen-Präparat inhärent stabil.

[0017] Jedoch weisen die feinen Teilchen aus Zuckerglas eine innewohnende Tendenz auf, in vielen nicht-wässrigen Flüssigkeiten wegen einer Phasentrennung Klumpen zu bilden. Da das Zuckerglas intensiv hydrophil ist, weisen die Teilchen eine starke Tendenz auf, aus einer kontinuierlichen hydrophoben Phase ausgeschlossen zu werden. und werden in Klumpen zusammengedrängt. Diese Aggregate setzen sich aus der Suspension ab und können nicht leicht als monodisperse Suspension durch Schütteln oder Beschallung rekonstituiert werden. Dies führt zu einer Ungleichförmigkeit der Arzneistoffdosis in der Suspension, und in den schlimmsten Fällen ist die Formulierung aufgrund von großen Klumpen, die die Nadel blockieren können, nicht injizierbar. Obwohl die ideale Suspension wasserfrei oder nahezu wasserfrei ist, haben wir gefunden, dass überraschend einfache Verfahren, die aus dem Gebiet der Stabilisierung von Wasser-in-Öl (WIÖ)-Emulsionen abstammen, eine glatte, monodisperse Einteilchen-Suspension von Mikrokügelchen in einer nicht-wässrigen Flüssigkeit erzeugen können.

[0018] Obwohl der Wassergehalt dieser Systeme sehr gering ist (<1 %), weisen Tenside, die gewöhnlich verwendet werden, um Wasser-in-Öl (WIÖ)-Emulsionen zu stabilisieren, bei etwa 0,01 % bis 10 %, bevorzugt

etwa 1 %, eine dramatische Wirkung auf. Sie zerkleinern die Aggregate von Glasteilchen zurück zu einer glatten monodispersen Suspension, die im Wesentlichen keine Tendenz zeigt, wieder zu verklumpen. Diese Tenside, die entweder ein niedriges oder sehr niedriges hydrophil-lipophiles Gleichgewicht (HLB) aufweisen, sind selbst in Wasser unlöslich, sind aber lipidlöslich. Tenside mit niedrigem HLB, wie Sorbitansesquioleat (Arlacel C, HLB=3,7), Mannidmonooleat (Arlacel A, HLB=4,3), Sorbitantristearat (Span 65, HLB=2,1) und Glycerolmonostearat (Arlacel 129, HLB=3,2) weisen eine sehr geringe Toxizität (orale LD₅₀ in Ratten > 15 g/kg) auf, werden bereits klinisch in WIÖ-Emulsionen, wie in Freund-Adjuvans, zur Injektion verwendet und sind für diesen Zweck von den Zulassungsbehörden zugelassen.

[0019] Bevorzugt wird das Tensid der kontinuierlichen nicht-wässrigen flüssigen Phase vor Zugabe der Pulver-Teilchen zugesetzt.

[0020] Arlacel A ist eine wesentliche Komponente des sogenannten "Freund-Adjuvans", das in großem Umfang bei der Immunisierung von Tieren verwendet wird, um maximale Titer von Serum-Antikörpern zu erzeugen. (Literatur: Handbook of Experimental Immunology, 4. Auflage, Hg. D.M. Weir, Mitherausgeber L. Herzenberg und L. Herzenberg, Band 1, S. 8.10 (1986)). Das Freund-Adjuvans ist im Grunde eine feine Wasser-in-Öl-Emulsion, in der das Antigen in der diskontinuierlichen Wasserphase gelöst ist, während die kontinuierliche Phase aus leichtem Paraffinöl als Reservoir wirkt, aus dem das Antigen langsam freigesetzt wird. Komplettes Freund-Adjuvans enthält auch durch Wärme abgetötetes Mycobakterium tuberculosis, das eine heftige Entzündung hervorruft, was die Reaktivität des Immunsystems erhöht. Dies schließt seine Verwendung beim Menschen aus.

[0021] Ein Hauptunterschied zwischen einer feinen Wasser-in-Öl-Emulsion wie dem Freund-Adjuvans und den hierin beschriebenen monodispersen Glas-in-Öl-Suspensionen ist die relativ geringe Dispergierungsenergie, die erforderlich ist, um die letztgenannten zu erzeugen. Während die Dispergierung der wässrigen Phase als feine Tröpfchen in einer WIÖ-Emulsion ein längeres und heftiges Mischen erfordert (ein Hochgeschwindigkeits-Homogenisator wird verwendet, um Freund-Adjuvans zu erzeugen, und wird gewöhnlich über 15 bis 30 Minuten bei einer Spitzengeschwindigkeit von > 18.000 U/min betrieben, bevor eine stabile Emulsion erzielt wird), erfordern die hierin beschriebenen stabilen Suspensionen nur die Zugabe des fein gepulverten Arzneistoffs zu dem Öl/Tensid-Grundmaterial und ein heftiges Schütteln, um die Phasen zu mischen. Eine kurze, < 5-minütige Einwirkung eines Ultraschallbads kann verwendet werden, um das Aufbrechen jeglicher kleiner Klumpen sicherzustellen, die sich vor oder während der Zugabe zu der hydrophoben Phase gebildet haben könnten.

[0022] Die feinen Mikrokügelchen aus Zuckerglas sind in dem hydrophoben Lösungsmittel vollständig unlöslich, sie sind ohne Tendenz umzukristallisieren in der Glasphase stabil, und die stabilisierten Moleküle in fester Lösung in den Glaskugeln sind ebenfalls stabil.

[0023] Ein signifikanter Nachteil von Pulvern, die durch herkömmliche Sprühtrocknungs-Technik erzeugt werden, ist die große Schwankung der üblicherweise erzeugten Teilchengröße. Weiter haben herkömmliche Sprühtrockner große Schwierigkeiten bei der Erzeugung von Teilchen mit einem mittleren Durchmesser, der signifikant kleiner als 5–10 µm ist. Teilchen dieser Größe setzen sich schnell in Flüssigkeiten niedriger Viskosität ab. Dies kann zu einer großen Schwankung in der Dosisverteilung innerhalb des Fläschchens und zu einem Erfordernis für ein häufiges und heftiges Schütteln zur Resuspendierung der Teilchen führen. Teilchen aus Zuckerglas mit einem Durchmesser von etwa 0,1 bis 1 µm wären besser, da sie durch normale thermodynamische Kräfte, wie die Brownsche Bewegung, in gleichmäßiger Suspension gehalten werden. Obwohl pharmazeutische Standard-Verarbeitungstechniken, wie ein Strahlmahlen, die Größe von Pulvern auf einen mittleren Durchmesser von etwa 1 bis 2 µm verringern können, ist es gewöhnlich nicht praktikabel, weit darunter zu gehen. Ein zusätzlicher Schritt, wie ein Strahlmahlen, würde natürlich die Verarbeitungskosten erhöhen.

[0024] Wenn Ultraschall-Vernebler anstelle von herkömmlichen Sprühdüsen verwendet werden, ist es möglich, eine Sprühtrocknungsvorrichtung zu modifizieren, so dass sie kleine und sehr gleichförmige Mikrokügelchen liefert. Es scheint kein Grund vorzuliegen, warum dieses Verfahren nicht an die sterile Verarbeitung von stabilisierten Impfstoffen in großen Mengen angepasst werden sollte. Ein Nachteil der Verringerung der Teilchengröße auf Submikrometer-Abmessungen in Luft oder einer kontinuierlichen Phase irgendeines anderen Gases sind die Materialverluste, denen man häufig wegen der Schwierigkeit der Abtrennung der feinen Teilchen aus dem Gasstrom begegnet. Alternativ ist eine pharmazeutische Standard-Hochdruck-Mikrohomogenisierungsausrüstung, wie der Microfluidizer (Constant Systems Inc.), der in großem Umfang verwendet wird, um sterile, stabile Mikroemulsionen zu erzeugen, auch bei der Erzeugung von stabilen Mikrosuspensionen durch Verringerung der mittleren Teilchengröße, die in der kontinuierlichen flüssigen Phase suspendiert sind,

wirksam. Dieses Verfahren ergibt eine praktisch vollständige Material-Zurückgewinnung und ist wahrscheinlich das Verfahren der Wahl, insbesondere bei seltenen oder teuren Wirkstoffen. Eine einzige Stufe wie diese könnte preiswert in das Produktionsverfahren integriert werden, da die Produktionskosten bei etwa \$ 1.000 pro Kilogramm Pulver liegen. Dieses würde etwa 20.000 Dosen eines Standard-Kinderimpfstoffes, wie DTP, enthalten, was 5 Cent zu den Kosten jeder Dosis hinzufügen würde. Da die Verluste der derzeitigen instabilen Impfstoffe vor Ort 50 % bis 90 betragen können, selbst bei einer teuren Kühlkette (Kühlung) vor Ort, würden die zusätzlichen Kosten von stabilen flüssigen Impfstoffen, die ohne Kühlkette auskommen könnten, schnell wieder eingebracht werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0025] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Erzeugung von stabilen Teilchen-in-Flüssigkeit (PIL)-Formulierungen zusammen mit den Produkten der Verfahren bereit. Die Teilchen liegen in feiner pulverförmiger Form vor, wobei sie bevorzugt Mikroteilchen mit einem Durchmesser von 10 Mikrometer oder weniger, am bevorzugtesten 1 Mikrometer oder weniger sind. Vorzugsweise zeigen die Teilchen keine große Schwankung der Teilchengröße. Die Teilchen sind im Wesentlichen trocken mit einem sehr niedrigen Wassergehalt von weniger als etwa 1 %. Die Teilchen können ein oder mehrere biomolekulare Produkte enthalten und können andere Additive, Hilfsstoffe und dergleichen enthalten. Das biomolekulare Produkt ist bevorzugt ein Arzneistoff oder ein anderer biologisch aktiver Bestandteil, wie ein Protein, Antikörper, Enzym (z.B. Restriktionsendonuklease) und dergleichen, schließt aber nicht andere biologische Materialien (z.B. Nahrungsmittel, Färbemittel, Getränke und dergleichen) aus. Die Teilchen sind in einer nicht-wässrigen Flüssigkeit suspendiert, in der sie unlöslich sind.

[0026] Gemäß der Erfindung wird eine Formulierung aus feinen trockenen Pulver-Teilchen bereitgestellt, die ein biomolekulares Produkt umfassen, wobei die Teilchen eine monodisperse Suspension in einer kontinuierlichen Phase aus einer biokompatiblen nicht-wässrigen Flüssigkeit darstellen, in der die Teilchen nicht löslich sind, wobei die kontinuierliche Phase ein lipidlösliches Tensid mit niedrigem HLB einschließen kann.

[0027] Die Suspensionsformulierung kann zum Beispiel etwa 1 % bis mehr als 50 %, z.B. 10 %, teilchenförmiges Produkt enthalten, obwohl eine Beladung mit mehr oder weniger bevorzugt sein kann, abhängig von der gewählten Anwendung und den gewählten Bestandteilen der Mischung.

[0028] Die Teilchen umfassen Moleküle des Produkts in einem Zuckerglas oder bestehen aus solchen. Das Produkt in dem Zuckerglas liegt entweder in stabiler fester Lösung vor oder liegt selbst in Suspension in dem Zuckerglas vor. Bevorzugt ist das Zuckerglas aus Trehalose gebildet.

[0029] In dieser Anmeldung ist der Ausdruck "Zucker" so zu verstehen, dass er nicht nur Disaccharid-Zucker, wie Trehalose, sondern auch Monosaccharid-Zucker und deren nicht-reduzierenden Derivate, wie Zuckeralkohole, einschließlich Mannit, Inosit, Xylit, Ribit und dergleichen, abdeckt, welche eine allgemeine Klasse von stabilisierenden glasbildenden Zuckern und Zucker-Derivaten bilden. Der Ausdruck "Zuckerglas" ist so zu verstehen, dass er nicht nur Gläser abdeckt, die leicht und rasch in einer wässrigen Umgebung gelöst werden, wie Trehalose-Glas, sondern auch Zuckergläser, in denen das Zucker-Molekül durch das Anbringen einer oder mehrerer hydrophober Seitenketten modifiziert worden ist, um das Glas in Körperflüssigkeiten langsamer löslich zu machen als der native Zucker, um eine gesteuerte Freisetzung eines biomolekularen Produkts zu ergeben.

[0030] Wenn die Formulierung für eine medizinische Verwendung, zum Beispiel als Injektions-Formulierung, bestimmt ist, muss die nicht-wässrige Flüssigkeit der kontinuierlichen Phase biokompatibel sein. Diese flüssige Phase kann ein injizierbares hydrophobes Lösungsmittel oder ein mit Wasser mischbares nichtwässriges Lösungsmittel sein. Da eine Zuckerglas-Stabilisierung des biomolekularen Produkts verwendet wird, ist es klar, dass die nicht-wässrige Flüssigkeit ein Nicht-Lösungsmittel für Zucker sein muss. Zum Beispiel könnte jedes nicht-wässrige nicht-toxische Öl, das für die parenterale Verwendung zugelassen ist, in der Erfindung verwendet werden. Ein niedrigviskoses Öl, wie Ethyloleat, ist geeignet und weist den Vorteil auf, dass es leicht zu injizieren ist. Mit Wasser mischbare nicht-wässrige Lösungsmittel umfassen Glycerol, Ethylenglycol, Propylen-glycol, Propylenoxid, Polypropylen-glycol.

[0031] Das lipidlösliche Tensid weist ein niedriges oder sehr niedriges HLB auf. Der Fachmann erkennt leicht, dass die Bedeutung dieser allgemeinen Ausdrücke, insbesondere im Zusammenhang mit den HLB-Werten, die in der beigefügten Beschreibung angegeben werden, bevorzugte Beispiele von Tensiden mit niedrigem HLB betrifft. Es ist ein besonders überraschender Aspekt der vorliegenden Erfindung, dass ein Tensid, das vom

kommerziellen Hersteller speziell für die Stabilisierung von Wasser-in-Öl-Emulsionen entwickelt wurde, überhaupt irgendeine Aktivität oder Nützlichkeit bei der Formulierung eines im Wesentlichen wasserfreien Präparats aufweisen würde. Die Tenside umfassen Sorbitansesquioleat, Mannidmonooleat, Sorbitantristearat und Glycerolmonostearat und Lecithin (Phosphatidylcholin) und auch Dipalmitoylphosphatidylcholin, Distearoylphosphatidylcholin und Dimyristoylphosphatidylcholin als Beispiele von normalen Körper-Komponenten mit Tensid-Wirkung, die vorteilhaft in dieser Technologie verwendet werden; auch die synthetischen und bereits zugelassenen Tenside, wie Sorbitanlaurat, -palmitat, -stearat und -oleat.

[0032] Dank der Erfindung ist es möglich, ein stabiles Teilchen in flüssigen Formulierungen zu erzeugen, in denen feines trockenes Pulver glatt als stabile monodisperse Suspension verteilt ist. Der Fachmann erkennt leicht, dass derartige monodisperse Suspensionen direkt entweder mittels Spritze und Nadel oder mittels Flüssigkeitsstrahl-Injektor injiziert werden könnten. Die Formulierungen können als solche injiziert werden, ohne eine Rekonstitution mit Lösungsmittel vor der Injektion zu erfordern. Dies ist ein klarer Vorteil, wenn die Bereitstellung von sterilen Bedingungen und sterilen Rekonstitutionslösungsmitteln und/oder -puffern problematisch ist. Die Teilchen in den flüssigen Formulierungen sind stabil, und dementsprechend ist es möglich, ohne das Erfordernis für eine Kühlung auszukommen.

[0033] Feste Lösungen von wasserfreiem Arzneistoff, der in Zuckerglas in feiner teilchenförmiger Form stabilisiert ist, sind leicht hydratisierbar. Es ist ein besonderer weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass biokompatible Formulierungen direkt in einen Empfänger injiziert werden können, mit dem Effekt, dass die normale physiologische wässrige Umgebung den Arzneistoff in situ hydratisieren wird. Man kann leicht erkennen, dass eine stabile, Temperaturunempfindliche, direkt injizierbare Arzneistoff-Formulierung ein sehr großes Potential in Impfprogrammen und für eine umfangreiche prophylaktische oder therapeutische Arzneistoff-Verabreichung aufweist.

[0034] Die Formulierungen der Erfindung können auch für Diagnostika und Reagenzien verwendet werden, wenn die nicht-wässrige Flüssigkeit wasserlöslich oder mit Wasser mischbar ist. Eine Flüssigkeitsabgabevorrichtung kann dann instabile diagnostische Reagenzien ohne Kühlung lagern und sie in Testsysteme abgeben, die auf Wasser basieren, wie Immunoassays, Diagnostika auf der Basis von DNA-Sonden, PCR-Reaktionen und dergleichen. Beim Kontakt mit Wasser in dem diagnostischen System löst sich das fein gepulverte diagnostische Reagens in dem nicht-wässrigen Vehikel sofort, und das Reagens wird voll aktiv. Als Beispiel kann dieses Verfahren für Restriktionsenzyme verwendet werden, welche zum Verdau von DNA an spezifischen Sequenzstellen verwendet werden.

[0035] Die Teilchen in einem speziellen Präparat mit kontinuierlicher Phase können von mehr als einer Art sein, die rasch miteinander reagieren, wenn sie in Wasser freigesetzt werden. Das Beispiel, das wir angeben, ist alkalische Phosphatase in einem Teilchen und p-Nitrophenylphosphat (deren Substrat) in dem anderen. Diese könnten ebenso leicht zwei Prodrug-Komponenten sein, die wechselwirken müssen, um einen aktiven Arzneistoff aus zwei Prodrugs zu erzeugen. Es könnten auch mehrere verschiedene Teilchen vorliegen, wie die einzelnen Komponenten eines polyvalenten Impfstoffs. Diese gehen keine zerstörerischen Wechselwirkungen in dem Öl ein, und sie haben keine Zeit wechselzuwirken, wenn sie im Körper rehydratisiert werden, da sie vom Injektionspunkt absorbiert und zu ihrer Wirkungsstelle transportiert werden.

[0036] In dem Restriktionsenzym-Beispiel können wir mehrere Reagenzien in getrennten Teilchen für komplexe Molekularbiologie-Techniken verwenden, wie die Komponenten der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder von Sequenzierungsreaktionen. In der erstgenannten würde ein Teilchen die DNA-Polymerase enthalten, eines würde einen Primer enthalten, und das dritte würde den anderen Primer enthalten, und ein viertes könnte die Nukleotide enthalten. In einer Sequenzierungsreaktion könnte die DNA-Polymerase in einem Teilchen und die Nukleotide und die Ketten-terminierenden Desoxynukleotide könnten in einem anderen vorliegen. Es ist klar, dass die Fähigkeit, verschiedene Reagenzien in nicht wechselwirkenden Teilchen in dem Öl zu mischen, viele Möglichkeiten für den Bau von leistungsfähigen und zweckmäßigen Kits ermöglicht.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0037] [Fig. 1](#) zeigt die zeitabhängige Aktivität von gefriergetrockneter alkalischer Phosphatase bei 37°C, 4°C und -20°C;

[0038] die [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) zeigen die Aktivität von trockenem Pulver oder Öl-Suspensions-Formulierungen von Trehalose-stabilisierter alkalischer Phosphatase bei 37°C und 55°C;

[0039] die [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) zeigen die Aktivität von gefriergetrocknetem und Trehalose-stabilisiertem trockenem Pulver oder Öl-Suspensionsformulierungen von rekombinantem EPO bei 37°C und 55°C; und

[0040] die [Fig. 6](#), [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) zeigen die Aktivität von gefriergetrocknetem und Trehalose-stabilisiertem trockenem Pulver oder Öl-Suspensionsformulierungen von EcoRI bei 4°C, 37°C und 55°C.

Beispiele

Beispiel 1 Alkalische Phosphatase

[0041] Das Enzym alkalische Phosphatase aus Rinder-Eingeweideschleimhaut EC Nummer 3.1.3.1 (Sigma-Aldrich Co. Ltd. p8647) wird gewöhnlich als gefriergetrocknetes Pulver erhalten. Dies erfordert eine wasserfreie Lagerung in einem Gefrierschrank bei <0°C, um die Aktivität des Enzyms zu konservieren. Selbst bei dieser Temperatur verliert das gefriergetrocknete Enzym allmählich die Aktivität. Wenn es bei höheren Temperaturen gelagert wird, tritt ein rascherer, temperaturabhängiger Aktivitätsverlust ein ([Fig. 1](#)).

Formulierung und Trocknung

[0042] Das Enzym wurde in einem Puffer gelöst, der zusammengesetzt war aus:

Substanz	Konzentration
Trehalose	0,6 M
Natriumsulfat	0,35 M
Rinderserum-Albumin	0,75 mM
Alkalische Phosphatase	40 Einheiten/ml
Zinkchlorid	1 mM
Magnesiumchlorid	1 mM

und in einem Labplant SD1-Sprühtrockner getrocknet. Die Trocknungsbedingungen waren: Einlasstemperatur 135°C, Auslasstemperatur 80°C, mit maximalem Luftstrom. Der Restwassergehalt des Glaspulvers am Ende dieses Verfahrens wurde mittels Thermogravimetrieanalyse (TGA) in einer Seiko SSC/5200-Maschine (Seiko Instruments Inc.) als 2 % gemessen.

Lagerung

[0043] Aliquoten von 100 mg des Pulvers wurden in 5 ml-Impfstofffläschchen abgewogen und unter Vakuum verschlossen. Andere Aliquoten wurden in Fläschchen abgewogen und in Ethyloleat pharmazeutischer Güte (Croda Chemical Company Ltd.) bei einer Konzentration von 200 mg/ml Öl resuspendiert. Diese Fläschchen wurden ebenfalls unter Vakuum verschlossen. Proben von sowohl dem trockenen Pulver als auch der Ölsuspension wurden dann über verschiedene Zeitspannen bei entweder 37°C oder 55°C gelagert.

Assay

[0044] Am Ende der Lagerzeitspanne wurden 5 ml-Volumina Puffer der folgenden Zusammensetzung, eingestellt auf pH 10,0 mit Natriumhydroxid-Lösung,

Substanz	Konzentration
Glycin	100 mM
Zinkchlorid	1 mM
Magnesiumchlorid	1 mM

dazugegeben, und die Fläschchen wurden 10 min bei 3.500 U/min in einer IEC Centra 413-Zentrifuge zentrifugiert. Dies hatte die Wirkung, dass die das Enzym enthaltenden Glasteilchen durch die Öl-Wasser-Grenzfläche überführt wurden und in dem Puffer gelöst wurden, um das verbleibende Enzym zurückzugewinnen. Die Menge an zurückgewonnenem Enzym war identisch, unabhängig davon, ob die Fläschchen heftig nach der Zugabe des wässrigen Puffers geschüttelt wurden oder nicht. Die Aktivität wurde unter Verwendung eines kinetischen Verfahrens zur Bestimmung von "Glycin-Einheiten" (Sigma-Aldrich Co. Ltd.) mit einem Shimadzu UV-160A-Spektrophotometer bei 37°C unter Verwendung von p-Nitrophenylphosphat-Substrat und Messen der Farbentwicklung bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Ergebnisse

[0045] Bei einer Lagerung bei 37°C gab es keinen Verlust an Enzymaktivität über 84 Tage Lagerung, weder bei dem trockenen Pulver noch bei der Ölsuspension ([Fig. 2](#)). Bei einer Lagerung bei 55°C gab es innerhalb der ersten 7 Tage einen leichten Verlust, aber über 90 % der Aktivität waren bis zu 84 Tage stabil ([Fig. 3](#)). Wann immer ein Unterschied zwischen der Öl- und Pulver-Probe auftrat, war die Erstgenannte besser, aber der Unterschied war nicht signifikant. Es wurden im Wesentlichen identische Ergebnisse erhalten, unabhängig davon, ob Mineralöl oder Ethyloleat als kontinuierliche Phase verwendet wurde.

[0046] In anderen Experimenten wurde die Sprühtrocknung unter Verwendung anderer Puffer-Zusammensetzungen vorgenommen, die Calciumlactat anstelle von Natriumsulfat oder Mannit anstelle von Trehalose enthielten. Diese ergaben im Wesentlichen ähnliche Ergebnisse. Die guten Ergebnisse mit glasbildenden Puffern auf Mannit-Basis waren besonders überraschend, da früher offenbarte Arbeiten angeführt hatten, dass es nicht möglich war, Monosaccharid-Zuckeralkohole als Stabilisierungsmittel zu verwenden (PCT-Anmeldung Nr. WO 91/18091 "Stabilisation of biological macro-molecular substances and other organic compounds", Roser B.J. und Colaco C.; US-Patent Nr. 5,621,094 "Method of Preserving Agarose Gel Structure During Dehydration by Adding a Nonreducing Glycoside of a Straight Chain Sugar Alcohol" Roser B. und Colaco C.; PCT-Anmeldung Nr. WO 96/05809 "Improved method for stabilisation of biological substances during drying and subsequent storage and compositions thereof" Colaco C., Roser B.J. und Sen S.). Dies ist klar nicht der Fall, vorausgesetzt, dass die Formulierung und Trocknungstechnik derart ist, dass sichergestellt ist, dass ein gutes Glas gebildet wird.

[0047] Als Anzeige für die Inertheit und Stabilität der in den Glaspulver in Suspension getrockneten Wirkstoffe wurden Mischungen von Pulvern, die alkalische Phosphatase enthielten – und Pulver, die p-Nitrophenylphosphat enthielten – in Mineralöl hergestellt und 7 Tage bei 55°C gelagert. Diese Suspensionen erschienen am Ende dieser Zeit unverändert. Nach Zugabe von 1 ml Wasser und Schütteln entwickelte sich sofort eine intensive gelbe Farbe in der getrennten wässrigen Phase, was anzeigte, dass das Wasser sowohl das Enzym als auch das Substrat reaktiviert hatte. Dieses Ergebnis zeigt, dass diese Präparate in demselben Vehikel Komponenten unterbringen können, die in herkömmlichen wässrigen Mischungen miteinander reagieren würden. Diese Eigenschaft sollte zum Beispiel in polyvalenten Impfstoffen von großem Wert sein. Es ist unserer Aufmerksamkeit nicht entgangen, dass sie auch ein gutes Modellsystem für die Entwicklung von sogenannten "binären" Arzneistoffen ist, bei denen die aktive End-Komponente durch eine chemische Reaktion synthetisiert oder freigesetzt wird, die nur beginnt, wenn die Vorstufen-Moleküle durch Körperflüssigkeiten benetzt werden.

Beispiel 2 Rekombinantes humanes Erythropoietin (EPO)

[0048] EPO wurde als Beispiel für ein modernes Pharmazeutikum gewählt, das durch gentechnische Herstellung eines rekombinanten Proteins in E. coli produziert wird.

[0049] Gefriergetrocknetes EPO wurde rehydratisiert und 100-fach mit einem Puffer der folgenden Zusammensetzung:

Substanz	Konzentration
Trehalose	0,6 M
Natriumsulfat	0,7 M
Rinderserum-Albumin	0,75 mM

verdünnt und wie oben in einem Sprühtrockner getrocknet. Das Pulver wurde zu 125 mg-Aliquoten abgewogen und bei einer Temperatur, die mit einer Geschwindigkeit von 15 Grad pro Stunde von 40°C auf 80°C anstieg, einer zweiten Trocknung unter Vakuum unterzogen und dann entweder in einem Serumfläschchen eingeschlossen oder in 0,5 ml Mineralöl BP resuspendiert und eingeschlossen. Sie wurden bis zu 15 Tagen bei 37°C oder 55°C gelagert. Am Ende der Lagerzeitspanne wurde verbleibendes EPO mit 0,01 % BSA enthaltender Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung wie oben extrahiert, und die verbleibende Menge im Extrakt wurde unter Verwendung eines EPO-spezifischen Quantikine IVD-Immunoassays (R&D Systems Inc.) gemessen.

[0050] Innerhalb eines Tages bei 37°C hat frisches EPO 88 % seiner Aktivität verloren, während das getrocknete Material, ob in Öl suspendiert oder nicht, voll aktiv ist ([Fig. 4](#)). Nach 15 Tagen gibt es einen kleinen Aktivitätsverlust, aber mehr als 90 % der Aktivität verbleibt. Bei Lagerung bei 55°C verliert frisches EPO >95 Aktivität innerhalb eines Tages ([Fig. 5](#)). Im Gegensatz dazu verliert das getrocknete Material am ersten Tag keine Aktivität und 15 Tage später können immer noch >80 % Aktivität zurückgewonnen werden.

Beispiel 3 Restriktionsendonuklease EcoRI

[0051] Restriktionsenzyme werden gewöhnlich in Gefrierschränken bei -20°C in Puffern aufbewahrt, die 50 % Glycerol enthalten, um eine Eisbildung zu verhindern. Selbst unter diesen Bedingungen weisen einige von ihnen eine begrenzte Lagerzeit auf und müssen in Intervallen ersetzt werden. Mehrere Enzyme wurden unter Verwendung der Technik der vorliegenden Erfindung mit ähnlichen Ergebnissen getrocknet. Die Daten bei einem Enzym, EcoRI, werden erläutert. Die Enzym-Lösung wurde 100-fach in SC-Puffer (Colaco C.A.L.S., Sen S., Thangavelu M., Pinder S. und Roser B. "Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology." Biotechnol. 10, 1007–1011 (1992)) verdünnt. Das getrocknete Enzym wurde wie oben in dem Sprühtrockner erzeugt, in Fläschchen mit oder ohne Öl eingeschlossen, und seine Stabilität wurde bei den drei Lagerungstemperaturen 4°C , 37°C und 55°C mit frischem flüssigem Enzym verglichen, das in Schneid-Puffer verdünnt war. Um die verbleibende Aktivität nach Lagerung zu bestimmen, wurde das System in der wässrigen Phase zurückgewonnen, wie zuvor beschrieben, mit SC-Puffer in einer 2-fachen Verdünnungsreihe verdünnt und verwendet, um $0,5\text{ }\mu\text{g}$ Phage lambda-DNA (Life Technologies Inc.) zu schneiden. Die Vollständigkeit des Schneidens bei verschiedenen Verdünnungen wurde durch Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese beurteilt, in der die Banden mittels Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Der Titer des Enzyms wurde als die maximale Verdünnung ausgedrückt, die ein vollständiges Schneiden zeigte, ohne dass Teilbanden erschienen.

[0052] Wenn sie bei 4°C gelagert wurden, zeigte keines der Präparate einen fortschreitenden Aktivitätsverlust über 28 Tage. Selbst das frische flüssige Präparat war bei dieser Temperatur stabil ([Fig. 6](#)). Bei 37°C verlor das frische Enzym im Wesentlichen alle Aktivität im Verlauf von 28 Tagen, während das getrocknete Enzym mit oder ohne zugesetztes Öl hoch aktiv war ([Fig. 7](#)). Die getrockneten Präparate zeigten die gleiche Aktivitätszurückgewinnung nach Lagerung bei 55°C , während bei dieser Temperatur das frische Enzym innerhalb von 7 Tagen vollständig inaktiv war ([Fig. 8](#)).

[0053] Diese Formulierungen von Restriktionsenzymen stellen einen bequemen neuen Weg zum Schneiden von DNA bereit. Das Öl, das suspendiertes Enzym-Pulver enthält, wird über eine DNA-Lösung geschichtet, gevortext und in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die Enzym-Suspension löst sich in der wässrigen Phase, welche die DNA enthält, und beginnt bei 37°C zu schneiden. Die Ölphase bildet eine bequeme Dampfbarriere, welche über dem Verdau liegt, um ein Verdampfen zu verhindern. Dieses Verfahren ist Molekularbiologen als üblicher Teil der Polymerase-Kettenreaktionstechnik bereits geläufig. Bei Raumtemperatur aufbewahrbare Restriktionsenzyme in einem nicht hygroskopischen Mineralöl-Vehikel stellen ein wertvolles und bequemes neues Produkt für die Molekularbiologie dar.

Patentansprüche

1. Stabile Partikel-in-Flüssigkeits-Formulierung, umfassend eine diskontinuierliche Phase aus Mikropartikeln, die in einer kontinuierlichen Phase suspendiert sind, bei der es sich um eine nicht-wässrige Flüssigkeit handelt, in der die Mikropartikel unlöslich sind, wobei die Mikropartikel feines pulverförmiges Zuckerglas umfassen, das mindestens ein biomolekulares Produkt hält, wobei das biomolekulare Produkt in dem Zuckerglas entweder in stabiler fester Lösung vorliegt oder selbst in Suspension in dem Zuckerglas vorliegt.
2. Formulierung nach Anspruch 1, in der die kontinuierliche Phase biokompatibel ist.
3. Formulierung nach Anspruch 1, in der die kontinuierliche Phase hydrophob ist.
4. Formulierung nach Anspruch 1, in der die kontinuierliche Phase eine oder mehrere hydrophobe Flüssigkeiten umfasst oder daraus besteht, die aus Sesamöl, Erdnussöl, Sojaöl, Ethyloleat und Mineralöl ausgewählt sind.
5. Formulierung nach Anspruch 1, in der die kontinuierliche Phase mit Wasser mischbar ist.
6. Formulierung nach Anspruch 1, in der die kontinuierliche Phase eine mit Wasser mischbare Flüssigkeit umfasst oder daraus besteht, welche aus Polyethylenglycol, Glycerol, Ethylenglycol, Propylenglycol, Propylenoxid und Polypropylenglycol ausgewählt ist.
7. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, in der der Zucker aus Trehalose, Palatinit, Glucopyranosylsorbit, Glucopyranosylmannit, Lactit und Monosaccharidalkoholen, wie Mannit und Inosit, ausgewählt ist.

8. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, in der die Mikropartikel einen Durchmesser von 0,1 bis 10 μm aufweisen.
9. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, in der die Mikropartikel einen Durchmesser von weniger als 1 μm aufweisen.
10. Formulierung nach Anspruch 7 oder Anspruch 8, in der die Mikropartikel keine große Schwankung der Teilchengröße zeigen.
11. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, in der die Mikropartikel im Wesentlichen trocken sind.
12. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, in der die Mikropartikel eine monodisperse Suspension in der kontinuierlichen Phase darstellen.
13. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, die 1 bis 50 Gew.-% Mikropartikel in der diskontinuierlichen Phase enthält.
14. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, in der die kontinuierliche Phase ein Lipid-lösliches Tensid mit einem niedrigen oder sehr niedrigen HLB einschließt.
15. Formulierung nach Anspruch 14, in der die Menge des Tensids in der kontinuierlichen Phase 0,01 bis 10 Volumen-% beträgt.
16. Formulierung nach Anspruch 14 oder Anspruch 15, in der das Tensid aus Sorbitansesquioleat, Manidmonooleat, Sorbitantristearat und Glycerolmonostearat, Lecithin (Phosphatidylcholin), Dipalmitoylphosphatidylcholin, Distearoylphosphatidylcholin, Dimyristoylphosphatidylcholin und Sorbitanlaurat, -palmitat, -stearat und -oleat ausgewählt ist.
17. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, in der das biomolekulare Produkt ein Arzneistoff ist.
18. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, in der das biomolekulare Produkt ein Protein, Antikörper oder Enzym ist.
19. Formulierung nach Anspruch 18, in der das biomolekulare Produkt eine Restriktionsendonuklease ist.
20. Formulierung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 16, in der das biomolekulare Produkt ein Nahrungsmittel, Färbemittel oder Getränk ist.
21. Formulierung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 16, die eine binäre Arzneistoff-Formulierung einschließt, in der das biomolekulare Produkt eine Arzneistoff-Vorstufe ist und in der der aktive Arzneistoff durch eine chemische Reaktion synthetisiert oder freigesetzt wird, die erst beginnt, wenn die Vorstufe durch Körperflüssigkeiten nach Verabreichung der Formulierung an einen Patienten benetzt wird.
22. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, die Mikropartikel umfasst, welche mehr als ein biomolekulares Produkt halten.
23. Formulierung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, die eine Mischung von Mikropartikeln umfasst, die mehr als eine Art biomolekulares Produkt freisetzen, wenn sie mit einer wässrigen Umgebung in Kontakt kommen.
24. Formulierung nach Anspruch 22 oder Anspruch 23, die zwei oder mehr biomolekulare Produkte umfasst, welche wechselwirken, wenn sie in einer wässrigen Umgebung freigesetzt werden.
25. Verfahren zur Herstellung einer stabilen Partikel-in-Flüssigkeits-Formulierung, welches die Zugabe von Mikropartikeln, die ein oder mehrere biomolekulare Produkte enthalten, welche in einem Zuckerglas gehalten werden, zu einer nicht-wässrigen kontinuierlichen flüssigen Phase umfasst, in der die Partikel nicht löslich sind, um eine Suspension zu bilden, wobei das biomolekulare Produkt in dem Zuckerglas entweder in stabiler fester Lösung vorliegt oder selbst in Suspension in dem Zuckerglas vorliegt.

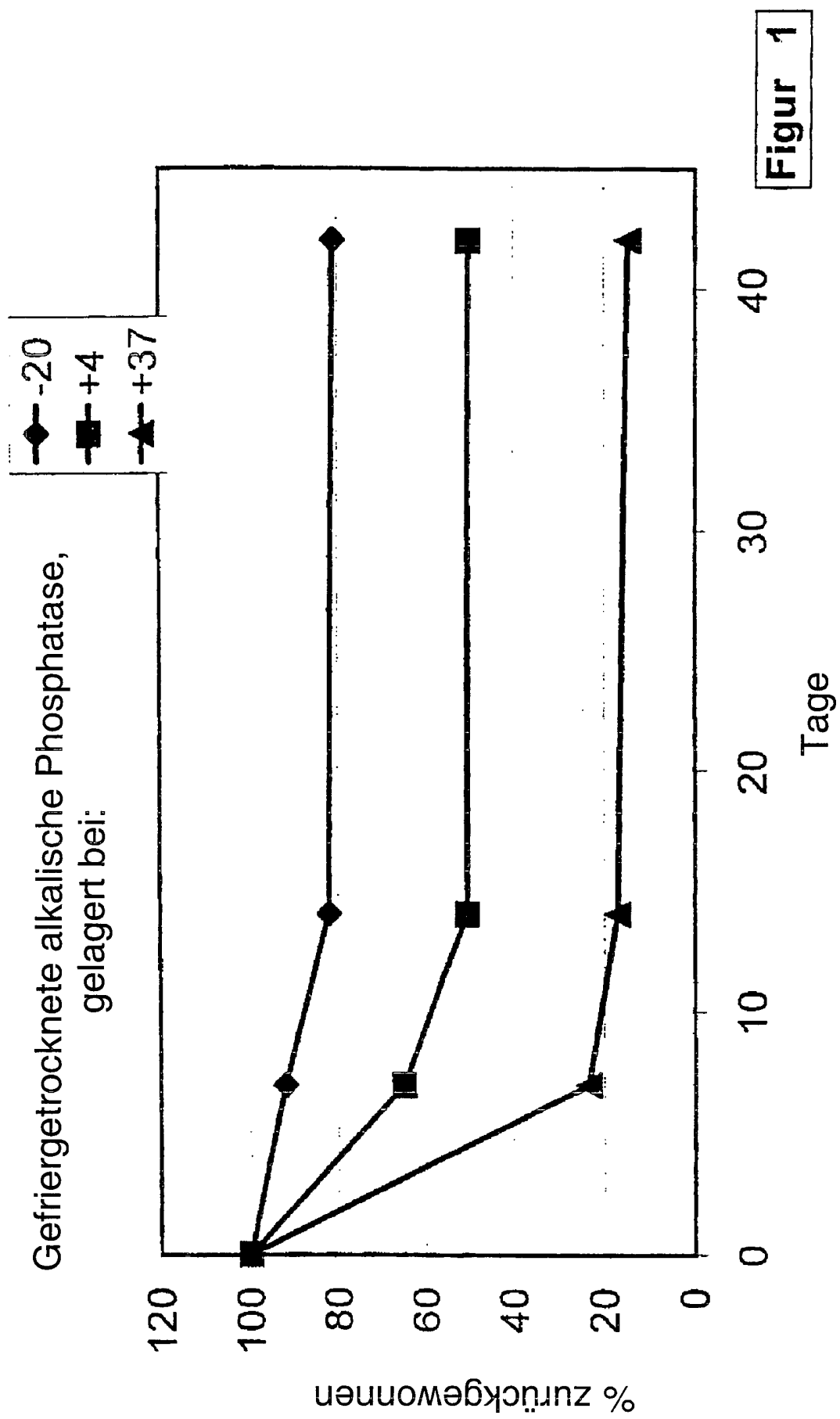
26. Verfahren nach Anspruch 24, in der in der kontinuierlichen Phase eine monodisperse Einzelpartikel-Suspension von Mikropartikeln erzeugt wird, indem man in die kontinuierliche Phase mindestens ein Tensid mit einem niedrigen oder sehr niedrigen HLB einschließt.

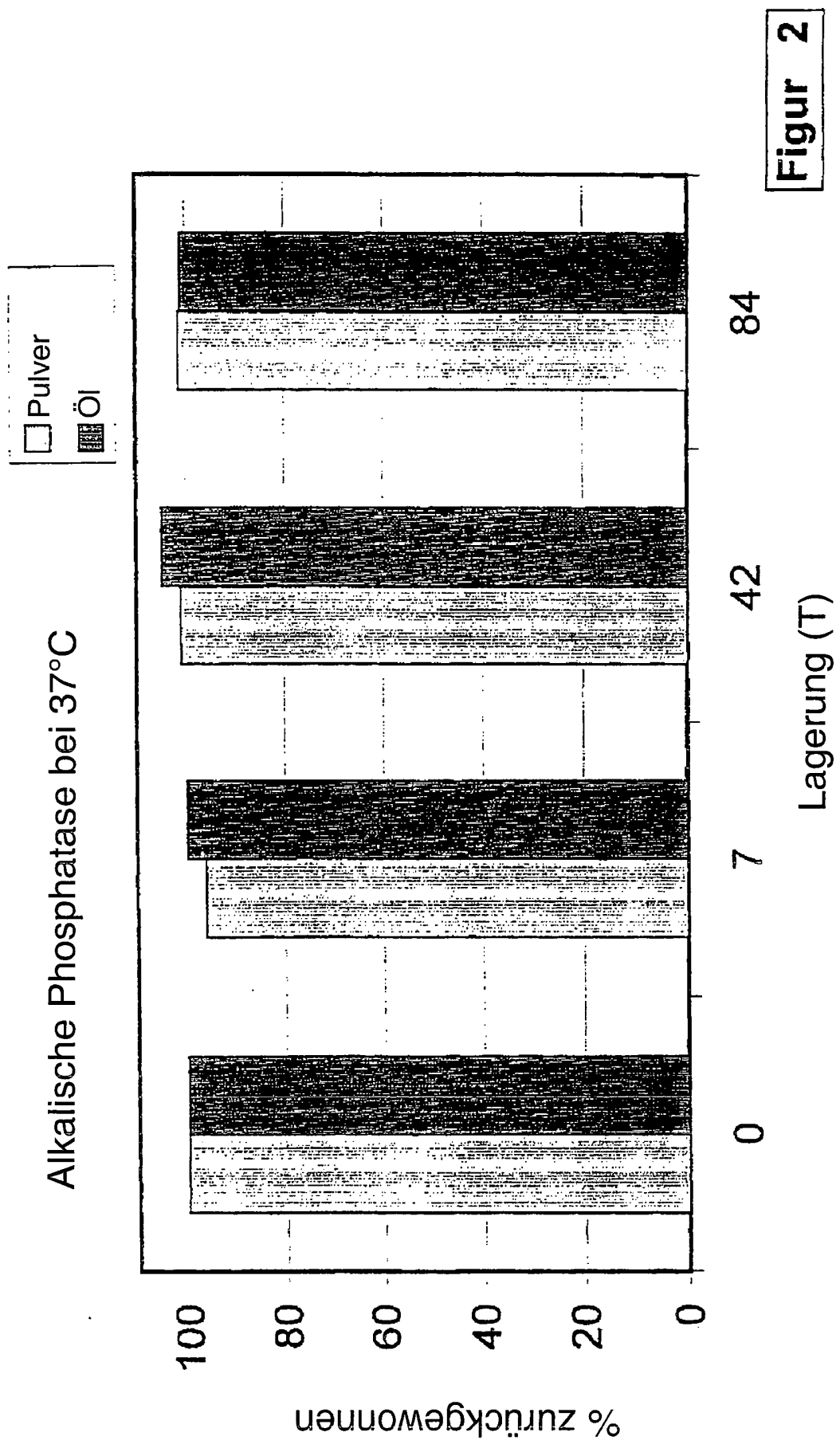
27. Verfahren nach Anspruch 26, in dem das Tensid vor Zugabe der Partikel zu der kontinuierlichen nicht-wässrigen flüssigen Phase gegeben wird.

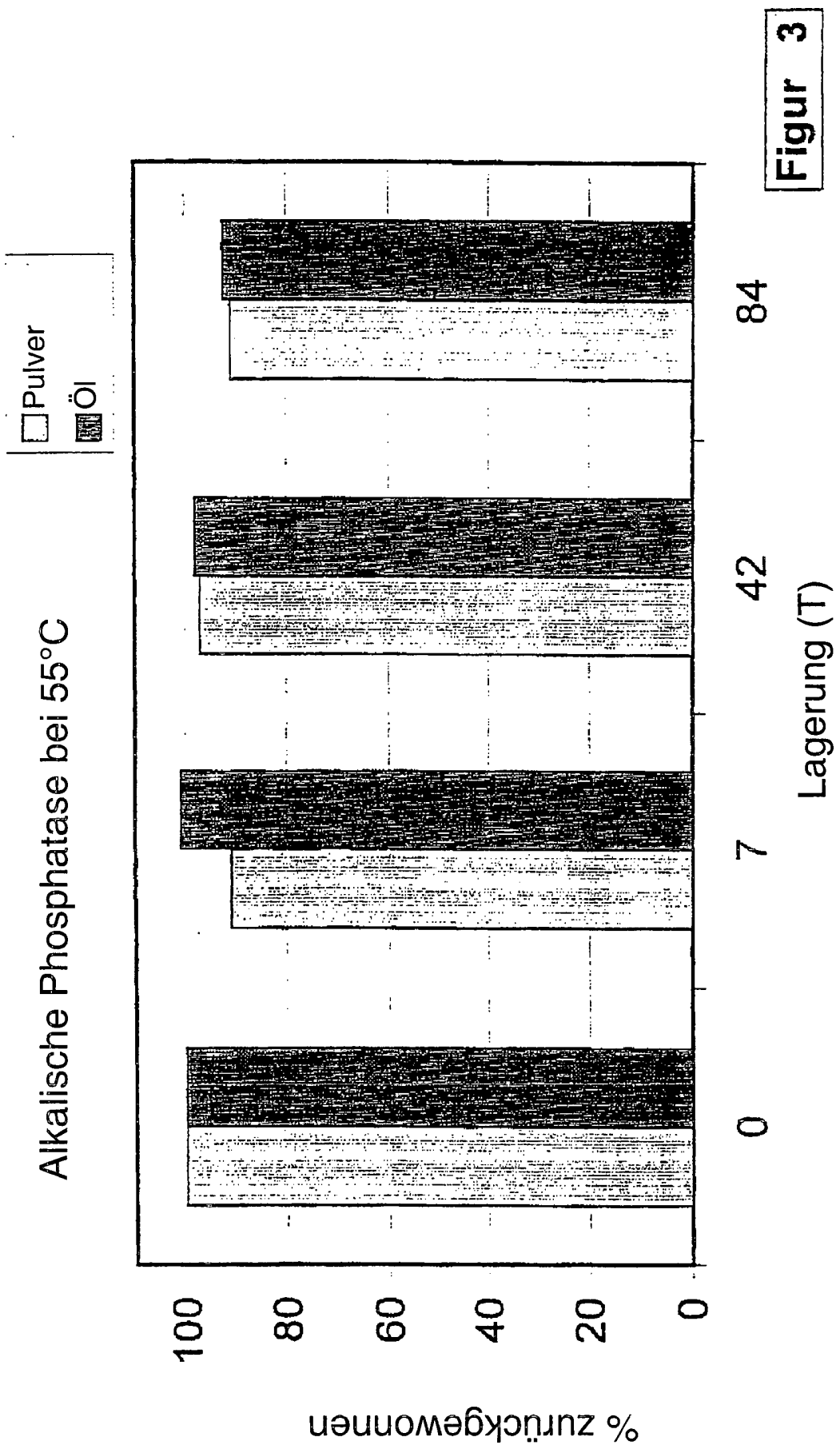
28. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 25 bis 27, in dem die Formulierung wie in irgendeinem der Ansprüche 2 bis 24 definiert ist.

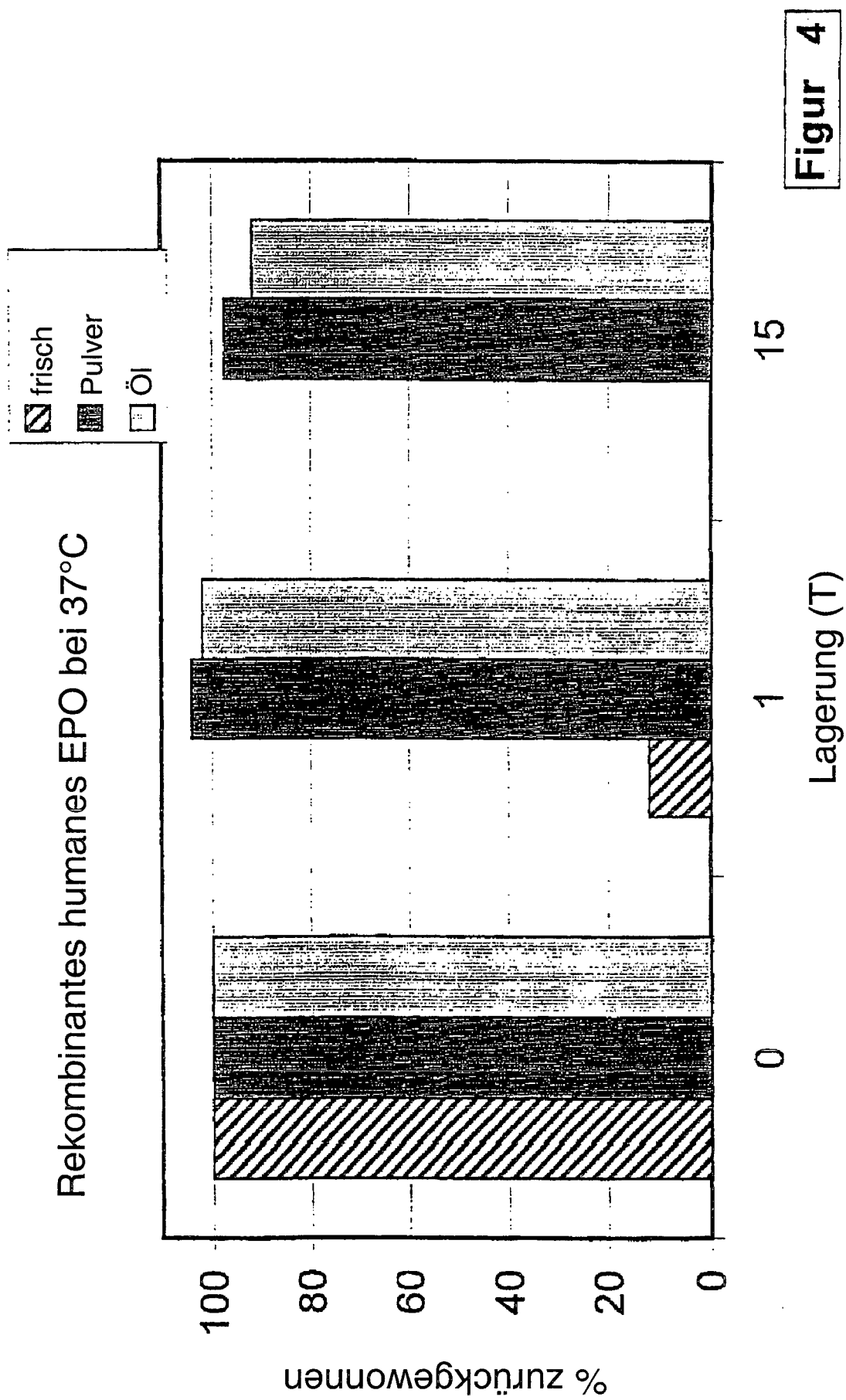
29. Verfahren zum Schneiden von DNA, umfassend das In-Kontakt-Bringen einer Formulierung nach Anspruch 19 mit einer wässrigen DNA-Lösung, wodurch sich die suspendierte Restriktionsendonuklease, die in dem Zuckerglas gehalten wird, in der wässrigen Lösung löst und die DNA schneiden kann.

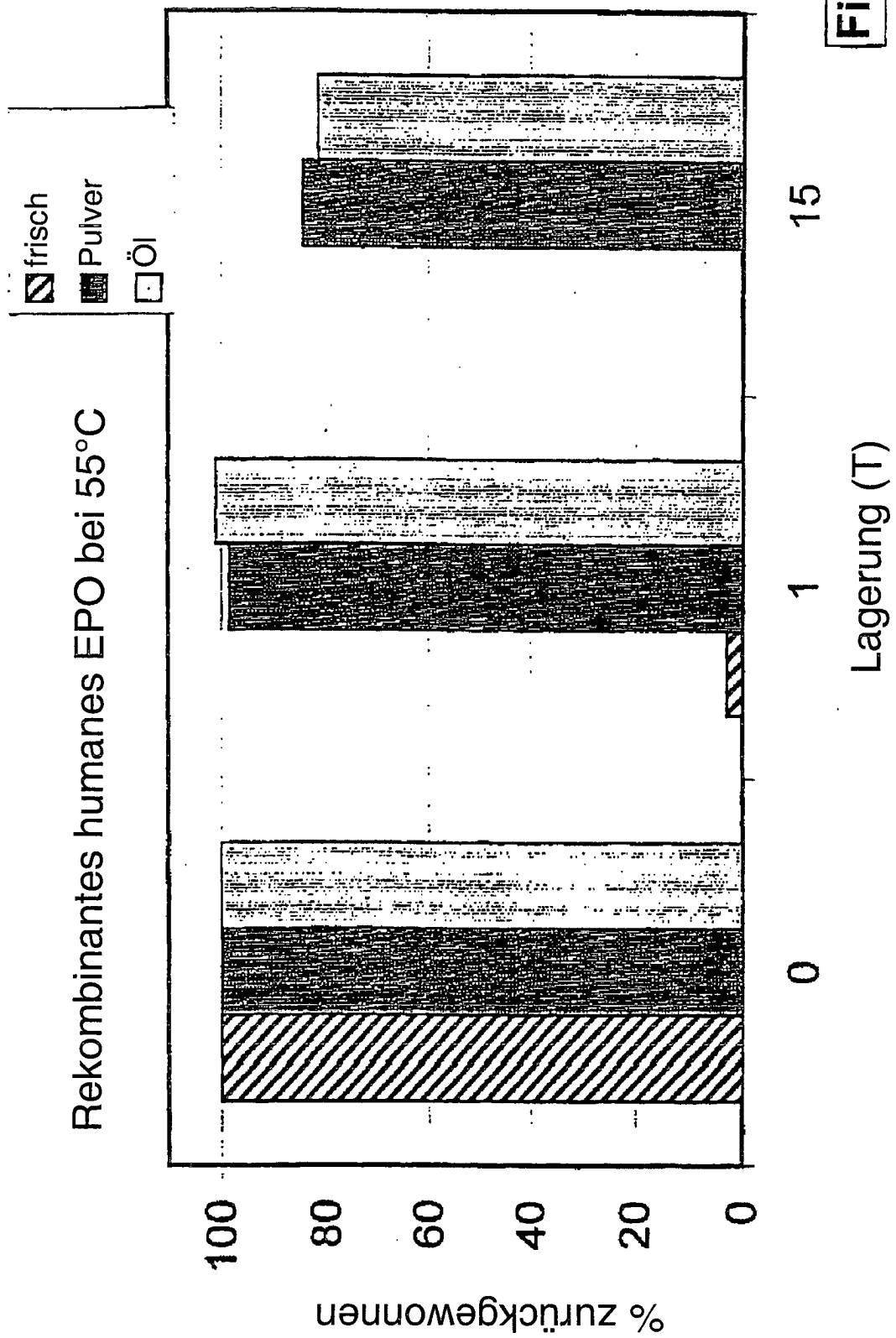
Es folgen 8 Blatt Zeichnungen











Figur 5

