(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 26 491 T3** 2009.07.30

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 743 860 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 26 491.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB95/02673**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 936 688.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/015814**
(86) PCT-Anmeldetag: **15.11.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **30.05.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.11.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **24.04.2002**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **31.12.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.07.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 49/00*** (2006.01)
B01J 13/04 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:
9423419 **19.11.1994** **GB**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Quadrant Drug Delivery Ltd., Ruddington, Nottingham, GB

(74) Vertreter:
Henkel, Feiler & Hänzel, 80333 München

(72) Erfinder:
OSBORNE, Nicholas, Nottingham NG4 2DJ, GB; SUTTON, Derek, Andrew, Nottinghamshire NG11 6FX, GB; JOHNSON, Alan, Richard, Nottingham NG2 5NA, GB

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG HOHLER MIKROSPHAEREN**

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 vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung hohler proteinhaltiger Mikrokapseln. Eine Verwendung dieser Mikrokapseln ist die Verstärkung einer Ultraschallbildgebung.

[0002] Die Tatsache, dass Luftblasen im Körper zur Echokardiographie verwendet werden können, ist seit einiger Zeit bekannt.

[0003] Die WO 92/18164 offenbart das Sprühtrocknen einer Lösung eines wandbildenden Materials, vorzugsweise eines Proteins, wie Albumin, zur Bildung von Mikrokapseln. In der WO 94/08627 wird der Druck, mit dem die Lösung in die erhitzte Kammer gesprüht wird, vermindert, um größere Mikrokapseln zu bilden, oder die Halbwertszeit der Mikrokapseln im Blutstrom wird beispielsweise durch Einbinden eines Netzmittels in die Lösung, die versprüht wird, erhöht oder die Mikrokapseln werden auf einen ausgewählten Teil des Körpers durch beispielsweise Suspendieren derselben in einer Lösung einer elektrisch geladenen Verbindung zielgerichtet.

[0004] Die US-A-4 420 442 (Sands; PQ Corpn) offenbart die Zugabe von organischen Lösemitteln zu Dispersionen filmbildender Feststoffe, bevor die Suspensionen zur Bildung hohler Mikrokügelchen sprühgetrocknet werden, jedoch waren die Lösemittel (beispielsweise Cellosolve oder Diglyme) weniger flüchtig als Wasser.

[0005] Wir ermittelten nun, dass durch Einbinden einer flüchtigen Verbindung in die wässrige Lösung, die sprühgetrocknet wird, Mikrokapseln mit verbesserten Eigenschaften in einer höheren Ausbeute, mit einer engeren Größenverteilung und dünneren Hüllen gebildet werden können.

[0006] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bildung von Mikrokapseln, durch
(i) Bereitstellen einer Lösung eines wasserlöslichen Materials in einem wässrigen Lösemittel und
(ii) Sprühen der Lösung in ein Gas derart, dass das wässrige Lösemittel verdampft, wodurch hohle Mikrokapseln gebildet werden,
das dadurch gekennzeichnet ist, dass die wässrige Lösung eine Flüssigkeit einer größeren Flüchtigkeit als Wasser enthält.

[0007] Geeignete flüchtige Flüssigkeiten umfassen Ethanol (die bevorzugte flüchtige Flüssigkeit) (Siedepunkt 78,3°C), Methanol (Kp 64,5°C) und Aceton (Kp 56°C). Die flüchtige Flüssigkeit muss als Lösemittel für das wandbildende Material fungieren und mit Wasser in den verwendeten Verhältnissen mischbar sein.

[0008] Der Anteil der wässrigen Lösung, der die flüchtige Flüssigkeit ist, variiert entsprechend der Identität der flüchtigen Verbindung, der Konzentration und Identität des wandbildenden Materials, der Temperatur und den Drücken, bei denen die Lösung versprüht wird, und dem gewünschten Mikrokapselprodukt. Typischerweise sind zwischen 0,1% und 80% (V/V), zweckmäßigerweise 1–50% (V/V) und vorzugsweise 5–30% (V/V), beispielsweise etwa 20% (V/V) der Lösung die flüchtige Flüssigkeit. Gemische flüchtiger Flüssigkeiten können verwendet werden, wobei sich diese Prozentangaben in diesem Fall auf den Gesamtgehalt der flüchtigen Flüssigkeit beziehen.

[0009] Das Sprühtrocknen kann ein einstufiges Verfahren sein, so dass das gewünschte Mikrokapselprodukt unmittelbar bereitgestellt wird. Alternativ kann das unmittelbare Produkt weiteren Verfahrensstufen, beispielsweise einem Erhitzen, um die Proteinhülle der Mikrokapseln weiter zu vernetzen und unlöslich zu machen, unterzogen werden. Dies bildet ein zweistufiges Verfahren.

[0010] Für ein Produkt, das in den Blutstrom des Menschen, beispielsweise als echogenes Kontrastmittel bei Ultraschalldiagnoseverfahren (was eine angestrebte Verwendung des Produkts ist), injiziert werden soll, wird das gesamte Verfahren vorzugsweise unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Daher ist die Proteinlösung steril und apyrogen, das Gas in der Kammer wird zunächst durch ein 0,2-µm-Filter geleitet, der Sprühtrockner wird am Anfang autoklavenbehandelt und dergleichen. Alternativ oder außerdem kann das Endprodukt sterilisiert werden, beispielsweise durch Einwirken von ionisierender Strahlung.

[0011] Das wandbildende Material ist ein wasserlösliches Material, vorzugsweise ein Protein (der Ausdruck soll hier nicht natürlich vorkommende Polypeptide und Polyaminosäuren umfassen). Beispielsweise kann es Kollagen, Gelatine oder (Serum)albumin, auf jeden Fall (wenn die Mikrokapseln an Menschen verabreicht werden) vorzugsweise von humaner Herkunft (d. h. von Menschen abgeleitet oder strukturmäßig einem humanen Protein entsprechend), oder Polylysin oder Polyglutamat sein. Es kann humanes Serumalbumin (HA) sein, das aus Blutspenden oder aus der Fermentation von Mikroorganismen (einschließlich Zelllinien), die so transfor-

miert oder transfiziert wurden, dass sie HA exprimieren, stammt. Alternativ können einfache oder komplexe Kohlehydrate, einfache Aminosäuren oder Fettsäuren verwendet werden, beispielswesie Lysin, Mannit, Dextran, Palmitinsäure oder Behensäure.

[0012] Verfahren zur Expression von HA (wobei dieser Ausdruck Analoga und Fragmente von humanem Albumin, beispielsweise die der EP-A-322094, und Polymere von monomerem Albumin umfasst) sind in beispielsweise EP-A-201239 und EP-A-286424 offenbart. "Analoga und Fragmente" von HA umfassen alle Polypeptide,

(i) die im erfindungsgemäßen Verfahren eine Mikrokapsel bilden können und

(ii) eine mindestens 80%ige Homologie (vorzugsweise eine mindestens 90%ige, 95%ige oder 99%ige Homologie) einer durchgängigen Region von mindestens 50% (vorzugsweise mindestens 75%, 80%, 90% oder 95%) der Aminosäuresequenz mit einer durchgängigen Region von mindestens 50% (vorzugsweise 75%, 80%, 90% oder 95%) eines naturidentischen humanen Albumins aufweisen.

[0013] HA, das durch gentechnologische Verfahren produziert ist, kann verwendet werden. Daher kann das HA durch Expression einer HA-codierenden Nucleotidsequenz in Hefe oder in einem anderen Mikroorganismus und Reinigen des Produkts, wie einschlägig bekannt ist, produziert werden. Diesem Material fehlen die mit von Serum stammendem Material verbundenen Fettsäuren. Vorzugsweise ist das HA im wesentlichen frei von Fettsäuren; d. h. es enthält weniger als 1% der Fettsäurekonzentration von von Serum stammendem Material. Vorzugsweise ist im HA keine Fettsäure nachweisbar.

[0014] Die wässrige Lösung oder Dispersion ist zweckmäßigerweise 0,1–50% (Gew/V), vorzugsweise etwa 1,0–25,0% (Gew/V) oder 5,0–30,0% (Gew/V) an Protein, insbesondere wenn das Material Albumin ist. Etwa 5–15% (Gew/V) sind optimal. Gemische von wandbildenden Materialien können verwendet werden, wobei in diesem Fall die Prozentangaben in den letzten beiden Sätzen sich auf den Gesamtgehalt des wandbildenden Materials beziehen.

[0015] Die zu versprühende Zubereitung kann andere Substanzen als das wandbildende Material, Wasser und flüchtige Flüssigkeit enthalten. So kann die wässrige Phase 1–20 Gew.-% wasserlösliche hydrophile Verbindungen, wie Zucker und Polymere, als Stabilisatoren, beispielsweise Polyvinylalkohol (PVA), Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyethylenglykol (PEG), Gelatine, Polyglutaminsäure und Polysaccharide, wie Stärke, Dextran, Agaragar, Xanthan und dergleichen, enthalten.

[0016] Funktionelle Mittel können eingebunden sein, beispielsweise mit 1,0–40,0 Gew.-%, wie Röntgenkontrastmittel (beispielsweise Hexabrix (Ioxaglinsäure), Optiray (Ioversol), Omnipaque (Iohexol) oder Isovice (Iopamidol)) oder Kernresonanzbildgebungsmittel (beispielsweise kolloides Eisenoxid oder Gadoliniumchelate, beispielsweise Gadopentetinsäure).

[0017] Ähnliche wässrige Phasen können als Trägerflüssigkeit verwendet werden, in der das fertige Mikrokapselprodukt vor der Verwendung suspendiert wird. Netzmittel können verwendet werden (0,1–5 Gew.-%), die die meisten physiologisch akzeptablen Netzmittel umfassen, beispielsweise Eilecithin oder Sojabohnenlecithin, oder synthetische Lecithine, wie gesättigte synthetische Lecithine, beispielsweise Dimyristoylphosphatidylcholin, Dipalmitoylphosphatidylcholin oder Distearoylphosphatidylcholin oder ungesättigte synthetische Lecithine, wie Dioleylphosphatidylcholin oder Dilinoleylphosphatidylcholin. Andere Netzmittel umfassen freie Fettsäuren, Ester von Fettsäuren mit Polyoxyalkylenverbindungen, wie Polyoxypropylenglykol und Polyoxyethylenglykol; Ether von Fettsäurealkoholen mit Polyoxyalkylenglykolen; Ester von Fettsäuren mit polyoxyalkyliertem Sorbitan; Seifen; Glycerin-Polyalkylenstearat; Glycerin-Polyoxyethylenricinoleat; Homo- und Copolymere von Polyalkylenglykolen; polyethoxyliertes Sojaöl und Rizinusöl sowie hydrierte Derivate; Ether und Ester von Saccharose oder anderen Kohlehydraten mit Fettsäuren, Fettalkoholen, wobei diese optional polyoxyalkyliert sind; Mono-, Di- und Triglyceride von gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren, Glyceriden oder Sojaöl und Saccharose. Vorzugsweise enthält die Trägerflüssigkeit jedoch kein Netzmittel.

[0018] Zusatzstoffe können in die Wand der Mikrokapseln zur Modifizierung der physikalischen Eigenschaften, wie Dispergierbarkeit, Elastizität und Wasserdurchlässigkeit, eingearbeitet werden.

[0019] Von den geeigneten Zusatzstoffen seien Verbindungen genannt, die die Wand "hydrophobisieren" können, um die Wasserdurchlässigkeit zu vermindern, wie Fette, Wachse und Kohlenwasserstoffe mit hohem Molekulargewicht. Zusatzstoffe, die die Dispergierbarkeit der Mikrokapseln im injizierbaren Flüssigkeitsträger erhöhen, sind amphipathische Verbindungen, wie die Phospholipide; sie erhöhen auch die Wasserdurchlässigkeit und die Rate der biologischen Abbaubarkeit. Vorzugsweise enthalten die Mikrokapseln jedoch keine Zu-

satzstoffe, die die Dispergierbarkeit der Mikrokapseln erhöhen, da wir ermittelten, dass sie unnötig sind, zumindest wenn die Mikrokapseln aus Albumin bestehen.

[0020] Die in der Wand einzuarbeitende Menge von Zusatzstoffen ist äußerst variabel und hängt von den Bedürfnissen ab. In einigen Fällen wird überhaupt kein Zusatzstoff verwendet; in anderen Fällen sind Mengen von Zusatzstoffen, die etwa 40,0% des Gewichts der Wand erreichen können, möglich.

[0021] Die Lösung des wandbildenden Materials wird durch eine beliebige geeignete Technik, die zu diskreten Mikrokapseln eines Durchmessers von 0,05–50,0 μm führt, zerstäubt und sprühgetrocknet. Diese Zahlen beziehen sich auf mindestens 90% des Volumens der Mikrokapseln, wobei der Durchmesser mit einem Coulter Multisizer II ermittelt wird. Der Ausdruck "Mikrokapseln" bedeutet hohle Teilchen, die einen Raum umfassen, wobei der Raum mit einem Gas oder Dampf, jedoch nicht mit festen Materialien gefüllt ist. Wabenförmige Teilchen, die den im Vereinigten Königreich als "Maltesers" (registriertes Warenzeichen) verkauften Süßwaren ähneln, werden nicht gebildet. Es ist nicht notwendig, dass der Raum vollständig umschlossen ist (obwohl dies bevorzugt ist) und es ist nicht notwendig, dass die Mikrokapseln genau kugelförmig sind, obwohl sie im allgemeinen kugelförmig sind. Wenn die Mikrokapseln nicht kugelförmig sind, beziehen sich die im vorhergehenden genannten Durchmesser auf den Durchmesser einer entsprechenden kugelförmigen Mikrokapsel, die die gleiche Masse aufweist und das gleiche Volumen eines Hohlraums wie die nicht kugelförmige Mikrokapsel umfasst.

[0022] Das Zerstäuben umfasst das Bilden eines Aerosols der Zubereitung durch beispielsweise Pressen der Zubereitung durch mindestens eine Öffnung unter Druck in eine Kammer mit warmer Luft oder einem anderen Inertgas oder durch die Verwendung eines Zentrifugenzerstäubers in einer Kammer mit warmer Luft oder einem anderen Inertgas. Die Kammer sollte so groß genug sein, dass die größten ausgestoßenen Tropfen vor dem Trocknen nicht auf die Wände treffen. Wenn die Mikrokapseln zur diagnostischen Bildgebung in den Blutstrom injiziert werden sollen, ist das Gas oder der Dampf in der Kammer rein (d. h. vorzugsweise steril und pyrogenfrei) und nicht-toxisch, wenn es an den Blutstrom in den mit der Verabreichung der Mikrokapseln bei Echokardiographie verbundenen Mengen abgegeben wird. Die Verdampfungsrate der Flüssigkeit aus der Proteinzubereitung sollte so ausreichend hoch sein, dass hohle Mikrokapseln gebildet werden, jedoch nicht so hoch sein, dass die Mikrokapseln bersten. Die Verdampfungsrate kann gesteuert werden, indem die Gasströmungsrate, die Konzentration des Proteins in der Proteinzubereitung, die Natur des flüssigen Trägers, die Zufuhrrate der Lösung und, was äußerst wichtig ist, die Temperatur des Gases, auf das das Aerosol trifft, variiert werden. Kleine Größenverteilungen werden durch ein Sprühtrocknen erreicht, bei dem eine niedrige Strömungsrate der Stammlösung mit einem sehr hohen Zerstäubungsgrad und einer sehr hohen Trocknungsluftmenge kombiniert wird. Die Wirkung besteht in der Herstellung von Mikrokapseln einer sehr definierten Größe und einer festen Größenverteilung. Mehrere Arbeiter entwickelten Gleichungen zur Festlegung der mittleren Tröpfchengröße pneumatischer Düsen; wobei eine einfache Fassung der verschiedenen Parameter, die die mittlere Tröpfchengröße beeinflussen können, die folgende ist:

$$D = A/(V^2 \cdot d)^a + B \cdot (M_{Luft}/M_{Flüssigkeit})^{-b}$$

worin

D	= mittlere Tröpfchengröße
A	= auf das Düsenmodell bezogene Konstante
B	= auf die Viskosität der Flüssigkeit bezogene Konstante
V	= relative Geschwindigkeit der Luft zwischen Flüssigkeit und Düse
d	= Luftdichte
M_{Luft} und $M_{Flussigkeit}$	= Masse des Luft- und Flüssigkeitsstroms
a und b	= auf das Düsenmodell bezogene Konstanten

(Zur Vermeidung von Zweifeln: V steht im Quadrat, $(V^2 \cdot d)$ besitzt die Potenz a und $(M_{Luft}/M_{Flüssigkeit})$ besitzt die Potenz minus b).

[0023] Es ist klar, dass bei einem gegebenen Düsenmodell die Tröpfchengröße am stärksten durch die relative Geschwindigkeit an der Düse und gleichzeitig das Massenverhältnis von Luft zu Flüssigkeit beeinflusst wird. Für die häufigsten Trocknungszwecke liegt das Verhältnis Luft/Flüssigkeit im Bereich von 0,1–10 und bei diesen Verhältnissen beträgt die mittlere Tröpfchengröße offensichtlich 15–20 μm. Für die Herstellung von Mikrokapseln im hier beschriebenen Größenbereich verwenden wir im allgemeinen Verhältnisse Luft/Flüssigkeit im Bereich von 20–1000. Die Wirkung besteht in der Herstellung von Teilchen bei den hohen Verhältnissen,

die nach Vergleichstandards ausnehmend klein mit sehr engen Größenverteilungen sind. Für bei den geringeren Verhältnissen von Luft zu Flüssigkeit hergestellten Mikrokapseln werden etwas größere Teilchen hergestellt, doch sie weisen immer noch feste Größenverteilungen auf, die gegenüber durch Emulsionsverfahren hergestellten Mikrokapseln hervorragend sind.

[0024] Eine Albuminkonzentration von 5,0–25,0 in Wasser, eine Einlassgastemperatur von mindestens etwa 100°C, vorzugsweise mindestens 110°C ist im allgemeinen ausreichend zur Sicherstellung der Hohlheit und die Temperatur kann bis zu 250°C betragen, ohne dass die Kapseln bersten. Etwa 180–240°C, zweckmäßigerweise etwa 210–230°C und vorzugsweise etwa 220°C sind, zumindest für Albumin, optimal. Die Temperatur kann, in der einstufigen Version des erfindungsgemäßen Verfahrens, ausreichend sein, um zumindest einen Teil (üblicherweise die Außenseite) des wandbildenden Materials und häufig im wesentlichen das gesamte wandbildende Material unlöslich zu machen. Da die Temperatur des Gases, auf das das Aerosol trifft, auch von der Rate, mit der das Aerosol zugeführt wird, und vom Flüssigkeitsgehalt der Proteinzubereitung abhängt, kann die Auslasstemperatur überwacht werden, um eine passende Temperatur in der Kammer sicherzustellen. Eine Auslasstemperatur von 40–150°C wurde als günstig ermittelt.

[0025] In dem zweistufigen Verfahren umfassen die Zwischenproduktmikrokapseln, wenn das wandbildende Material ein Protein ist, typischerweise 96–98% monomeres Protein und sie besitzen die gleiche Wasserlöslichkeit wie das wandbildende Material selbst. Sie besitzen eine begrenzte In-vivo-Lebensdauer für Ultraschallbildgebung. Sie können jedoch zur Ultraschallbildgebung verwendet werden oder sie können gelagert und transportiert werden, bevor die zweite Stufe des zweistufigen Verfahrens durchgeführt wird. Sie bilden daher einen weiteren Gegenstand der Erfindung.

[0026] In der zweiten Stufe des Verfahrens werden die in der ersten Stufe hergestellten Zwischenproduktmikrokapseln fixiert und weniger wasserlöslich gemacht, so dass sie länger bestehen können, wobei sie nicht so unlöslich und inert sind, als dass sie nicht biologisch abbaubar sind. Diese Stufe verfestigt die Mikrokapseln auch derart, dass sie den Härten der Verabreichung, einer vaskulären Scherung und eines ventrikulären Drucks besser widerstehen können. Wenn die Mikrokapseln bersten, werden sie weniger echogen. Schneider et al. (1992), Invest. Radiol. 27, 134–139, zeigten, dass ultraschallbehandelte Albuminmikrobläschen des Standes der Technik diese Festigkeit nicht aufweisen und ihre Echogenität rasch verlieren, wenn sie für das linke Ventrikel typischen Drücken ausgesetzt werden. Die zweite Stufe des Verfahrens kann Wärme (beispielsweise Mikrowellenwärme, Strahlungswärme oder heisse Luft, beispielsweise in einem herkömmlichen Ofen), ionisierende Strahlung (mit beispielsweise einer Gammastrahlendosis von 10,0–100,0 kGy) oder eine chemische Vernetzung in Lösemitteln unter Verwendung von beispielsweise Formaldehyd, Glutaraldehyd, Ethylenoxid oder anderen Mitteln zur Vernetzung von Proteinen verwenden und sie wird an den in der ersten Stufe gebildeten, im wesentlichen trockenen Zwischenproduktmikrokapseln oder einer Suspension dieser Mikrokapseln in einer Flüssigkeit, in der die Mikrokapseln unlöslich sind, beispielsweise einem geeigneten Lösemittel, durchgeführt. In der einstufigen Version des Verfahrens kann ein Vernetzungsmittel, wie Glutaraldehyd, in die Sprühtrocknungskammer gesprüht oder direkt stromaufwärts der Sprühvorrichtung in die Proteinzubereitung eingeführt werden. Alternativ kann die Temperatur in der Kammer hoch genug sein, um die Mikrokapseln unlöslich zu machen.

[0027] Das Endprodukt, das auf die gleiche Weise wie die Zwischenproduktmikrokapseln gemessen wird, kann nach Wunsch aus Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 0,1–50,0 μm bestehen, doch sind Volumenbereiche von 0,1–20,0 μm und insbesondere 1,0–8,0 μm mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich und für Echokardiographie bevorzugt. Es ist die Tatsache zu berücksichtigen, dass die zweite Stufe die Größe der Mikrokapseln hinsichtlich der Bestimmung der in der ersten Stufe erzeugten Größe ändern kann.

[0028] Es wurde ermittelt, dass das erfindungsgemäße Verfahren gesteuert werden kann, um Mikrokapseln mit gewünschten Eigenschaften zu erhalten. So kann der Druck, mit dem die Proteinlösung der Sprühdüse zugeführt wird, auf beispielsweise 1,0–20,0 × 10^5 Pa, zweckmäßigerweise 5,0–10,0 × 10^5 Pa und vorzugsweise etwa 7,5 × 10^5 Pa variiert werden. In ähnlicher Weise kann die Strömungsrate der Flüssigkeit variert werden. Andere Parameter können, wie im vorhergehenden und folgenden beschrieben, variiert werden. Auf diese Weise können neuartige Mikrokapseln erhalten werden. Wir ermittelten, dass aus Stammlösungen, die flüchtige Komponenten enthalten, gebildete Mikrokapseln stärker intakte hohle Kapseln mit glatteren Oberflächen liefern und kleiner als in Abwesenheit einer flüchtigen Komponente gebildete Kapseln sind.

[0029] Insbesondere kann ein Produkt mit einem hohen Reflektivitätsgrad, bezogen auf die Menge des wandbildenden Materials, erhalten werden.

[0030] Vorzugsweise sind mindestens 50% des Proteins in den Wänden der Mikrokapseln vernetzt. Vorzugsweise sind mindestens 75%, 90%, 95%, 98,0%, 98,5% oder 99% des Proteins so ausreichend vernetzt, dass sie gegenüber einer Extraktion mit einer 1%igen HCl-Lösung während 2 min beständig sind. Extrahiertes Protein wird unter Verwendung des Coomassie-Blue-Proteintests, Bradford, nachgewiesen. Der Grad der Vernetzung wird durch Variieren des Erhitzens, der Bestrahlung oder der chemischen Behandlung des Proteins gesteuert. Während des Vernetzungsverfahrens wird ein Proteinmonomer vernetzt und es steht rasch für einen einfachen Lösungsprozess nicht zur Verfügung, wie durch Gelpermeation-HPLC oder Gelelektrophorese, wie im folgenden Beispiel 3 gezeigt ist, nachgewiesen wird. Eine fortgesetzte Behandlung führt zu einer weiteren Vernetzung von bereits vernetztem Material, so dass es bei der im vorhergehenden beschriebenen HCl-Extraktion nicht zur Verfügung steht. Während eines Erhitzens auf 175°C verlieren HA-Mikrokapseln gemäß der Erfindung im Verlaufe von 20 min etwa 99% des HCl-extrahierbaren Proteins, wohingegen ein Erhitzen bei 150°C während 20 min lediglich etwa 5% HCl-extrahierbares Protein entfernt, während 30 min 47,5%, während 40 min 83%, während 60 min 93%, während 80 min 97% und während 100 min 97,8% des HCl-extrahierbaren Proteins entfernt. Um gute Vernetzungsgrade zu erreichen, können die Mikrokapseln daher auf 175°C während mindestens 17–20 min, auf 150°C während mindestens 80 min und auf andere Temperaturen während entsprechend längerer oder kürzerer Zeiträume erhitzt werden.

[0031] Die erfindungsgemäßen Mikrokapseln können trocken in Gegenwart oder in Abwesenheit von Zusatzstoffen zur Verbesserung der Haltbarkeit, zur Verhinderung eines Zusammenfallens oder zur Unterstützung einer Resuspendierung gelagert werden. Als Additive können 0,1–200,0 Gew.-% wasserlösliche, physiologisch akzeptable Verbindungen, wie Mannit, Galactose, Lactose oder Saccharose, oder hydrophile Polymere, wie Dextran, Xanthan, Agaragar, Stärke, PVP, Polyglutaminsäure, Polyvinylalkohol (PVA) und Gelatine, gewählt werden. Die verwendbare Lebensdauer der Mikrokapseln in der injizierbaren flüssigen Trägerphase, d. h. die Zeitspanne, während der verwendbare echographische Signale beobachtet werden, kann in Abhängigkeit von den Erfordernissen auf eine Dauer von einigen Minuten bis zu mehreren Monaten gesteuert werden; dies kann durch Steuern der Porosität, der Löslichkeit oder des Vernetzungsgrades der Wand erfolgen. Diese Parameter können durch eine passende Wahl der wandbildenden Materialien und Zusatzstoffe und durch Einstellen der Verdampfungsrate und Temperatur in der Sprühtrocknungskammer gesteuert werden.

[0032] Zur Minimierung einer Agglomeration der Mikrokapseln können die Mikrokapseln mit einem geeigneten inerten Streckmittel unter Verwendung einer mit einem 0,5-mm-Sieb ausgestatteten Fritsch-Zentrifugenstiftmühle oder einer Glen Creston-Luftstrahlmühle gemahlen werden. Geeignete Streckmittel sind feingemahlene Pulver, die inert und für intravenöse Zwecke geeignet sind, wie Lactose, Glucose, Mannit, Sorbit, Galactose, Maltose oder Natriumchlorid. Sobald es gemahlen ist, kann das Mikrokapseln/Streckmittel-Gemisch in einem wässrigen Medium suspendiert werden, um die Entfernung von nichtfunktionellen/fehlerhaften Mikrokapseln zu erleichtern, oder es kann in die Endbehälter zur Verteilung ohne eine weitere Behandlung gegeben werden. Zur Erleichterung einer anschließenden Wiederherstellung in der wässrigen Phase kann eine Spurenmenge eines Netzmittels in der Mahlstufe und/oder in dem wässrigen Medium zur Verhinderung einer Agglomeration eingebunden werden. Für diesen Zweck geeignete anionische, kationische und nichtionische Netzmittel umfassen Poloxamere, Sorbitanester, Polysorbate und Lecithin.

[0033] Die Mikrokapselsuspension kann dann Aufschwimmen gelassen werden, oder sie kann zentrifugiert werden, um etwaige fehlerhafte Teilchen, die Oberflächendefekte aufweisen, die bei der Verwendung bewirken, dass sie sich mit Flüssigkeit füllen und nicht länger echogen sind, zu sedimentieren.

[0034] Die Mikrokapselsuspension kann dann erneut gemischt, um eine gleichmäßige Teilchenverteilung sicherzustellen, gewaschen und in einem zur intravenösen Injektion geeigneten Puffer, wie isotonischem Mannit, wiederhergestellt werden. Die Suspension kann zum Gefriertrocknen und zu einer anschließenden Sterilisierung durch beispielsweise Gammastrahlung, trockenes Erhitzen oder Ethylenoxid in Aliquots aufgeteilt werden.

[0035] Ein alternatives Verfahren zur Desagglomeration der unlöslich gemachten oder fixierten Mikrokapseln besteht darin, diese direkt in einem wässrigen Medium, das ein geeignetes Netzmittel, beispielsweise Poloxamere, Sorbitanester, Polysorbate und Lecithin, enthält, zu suspendieren. Eine Desagglomeration kann dann unter Verwendung eines geeigneten Homogenisators erreicht werden.

[0036] Die Mikrokapselsuspension kann dann Aufschwimmen gelassen werden oder sie kann wie oben zur Sedimentierung der fehlerhaften Teilchen zentrifugiert und ferner wie oben behandelt werden.

[0037] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Produkt der Wärmefixierstufe durch

Mahlen wie oben desagglomeriert.

[0038] Obwohl die Mikrokapseln der vorliegenden Erfindung im trockenen Zustand vertrieben werden können, kann es, insbesondere wenn sie mit einer begrenzten Lebensdauer nach einer Injektion gestaltet sind, günstig sein, auch gebrauchsfertige Zubereitungen, d. h. zur Injektion fertige Suspensionen von Mikrokapseln in einem wässrigen flüssigen Träger, zu verkaufen.

[0039] Das Produkt wird jedoch im allgemeinen als trockenes Pulver vertrieben und gelagert und es wird unmittelbar vor der Verabreichung in einer geeigneten sterilen apyrogenen Flüssigkeit suspendiert. Die Suspension wird im allgemeinen durch Injektion von etwa 1,0–10,0 ml in eine geeignete Vene, wie die Cubitusvene, oder ein anderes Blutgefäß, verabreicht. Eine Mikrokapselkonzentration von etwa $1{,}0 \times 10^5$ bis $1{,}0 \times 10^{12}$ Teilchen/ml ist günstig, von etwa $5{,}0 \times 10^5$ bis $5{,}0 \times 10^9$ bevorzugt.

[0040] Obwohl Ultraschallbildgebung für verschiedene Organsysteme des Tierkörpers und menschlichen Körpers verwendbar ist, ist eine ihrer Hauptanwendungen die Bildgebung von Myokardgewebe und Perfusions- oder Durchblutungsmustern.

[0041] Die Verfahren verwenden eine aus einem Scanner und einer Bildgebungsvorrichtung bestehende Ultraschallabtasteinrichtung. Die Einrichtung erzeugt sichtbare Bilder eines vorgegebenen Bereichs, in diesem Fall der Herzregion eines menschlichen Körpers. Typischerweise wird der Sensor direkt auf der Haut über dem abzubildenden Bereich plaziert. Der Scanner umfasst verschiedene elektrische Komponenten einschließlich von Ultraschallsensoren. Der Sensor erzeugt Ultraschallwellen, die eine Sektorabtastung der Herzregion durchführen. Die Ultraschallwellen werden durch die verschiedenen Teile der Herzregion reflektiert und vom Empfangssensor empfangen und gemäß einschlägig bekannten Pulsechoverfahren verarbeitet. Nach der Verarbeitung werden Signale an die (ebenfalls einschlägig bekannte) Bildgebungsvorrichtung zum Betrachten gesendet.

[0042] Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird, nachdem der Patient "vorbereitet" ist und der Scanner sich an Ort und Stelle befindet, die Mikrokapselsuspension, beispielsweise durch eine Armvene, injiziert. Das Kontrastmittel fließt durch die Vene zur rechten venösen Seite des Herzens, durch die zu den Lungen führende Hauptlungenarterie, durch die Lungenflügel, durch die Kapillaren, in die Lungenvene und schließlich in den linken Vorhof und die linke Ventrikelhöhle des Herzens.

[0043] Mit den erfindungsgemäßen Mikrokapseln können Beobachtungen und Diagnosen im Hinblick auf die für Blut erforderliche Zeit zum Passieren der Lungenflügel, Durchblutungsmuster, die Größe des linken Vorhofs, die Kompetenz der Mitralklappe (die den linken Vorhof und die linke Kammer trennt), Kammerabmessungen in der linken Ventrikelhöhle und Wandbewegungsanomalitäten gemacht werden. Bei Ausstoßen des Kontrastmittels aus der linken Kammer kann die Kompetenz der Aortaklappe ebenfalls analysiert werden sowie der Ausstoßbruchteil oder -prozentsatz des aus der linken Kammer ausgestoßenen Volumens. Schließlich geben die Kontrastmuster im Gewebe an, welche Bereiche gegebenenfalls nicht adäquat durchblutet sind.

[0044] Zusammenfassend kann ein solches Bildmuster die Diagnose von unüblichen Durchblutungseigenschaften im Herzen, der Klappenkompetenz, der Kammergrößen und der Wandbewegung unterstützen und eine mögliche Anzeige für eine Myokardperfusion liefern.

[0045] Die Mikrokapseln können eine Bildgebung des linken Herzens durch intravenöse Injektionen ermöglichen. Die Albuminmikrokapseln können, wenn sie in eine periphere Vene injiziert werden, zu einer Transpulmonalpassage fähig sein. Dies führt zu einer echokardiographischen Opakifizierung der linken Ventrikel(LV)-Höhle sowie von Myokardgewebe.

[0046] Neben dem oben kurz beschriebenen Scanner bestehen andere Ultraschallabtastvorrichtungen, für die Beispiele in den US-Patenten Nr. 4 134 554 und 4 315 435 offenbart sind. Grundlegend betreffen diese Patente verschiedene Verfahren einschließlich dynamischer Querschnittsechographie (DCE) zur Erzeugung sequenzieller zweidimensionaler Bilder von Querschnitten der Anatomie von Menschen oder Tieren mittels Ultraschallenergie mit einer ausreichenden Bildrate, um eine dynamische Visualisierung sich bewegender Organe zu ermöglichen. Bei DCE verwendete Arten von Vorrichtungen werden im allgemeinen DCE-Scanner genannt und sie übertragen und empfangen kurze Schallpulse in der Form enger Strahlen oder Linien. Die reflektierte Signalintensität ist eine Funktion der Zeit, die unter Verwendung einer nominellen Schallgeschwindigkeit in eine Position umgewandelt wird und in einer zu Radar oder Sonaranzeigen in etwa analogen Weise auf einer Kathodenstrahlröhre oder anderen geeigneten Vorrichtungen angezeigt wird. Während DCE zur Erzeu-

gung von Bildern von vielen Organsystemen einschließlich von Leber, Gallenblase, Pankreas und Niere verwendet werden kann, wird es häufig zur Visualisierung von Gewebe und Hauptblutgefäßen des Herzens verwendet.

[0047] Die Mikrokapseln können zur Bildgebung einer großen Vielzahl von Bereichen, auch wenn sie an einer peripheren venösen Stelle injiziert werden, verwendet werden. Diese Bereiche umfassen (ohne Beschränkung):

(1) das venöse Drainagesystem zum Herzen;

(2) das Myokardgewebe und Perfusionseigenschaften während eines Belastungstests oder dergleichen; und

(3) Myokardgewebe nach der oralen Aufnahme oder intravenösen Injektion von zur Verstärkung der Durchblutung des Gewebes konzipierten Arzneimitteln.

[0048] Außerdem können die Mikrokapseln bei der Wiedergabe von Veränderungen der Myokardgewebeperfusion aufgrund von Eingriffen, wie

(1) Koronararterienvenentransplantation;

(2) Koronararterienangioplastik (Ballondilatation einer verengten Arterie);

(3) Verwendung von thrombolytischen Mitteln (wie Streptokinase) zum Auflösen von Gerinnseln in Koronararterien;

oder (4) Perfusionsdefekte oder Veränderungen aufgrund einer kurz vorhergehenden Herzattacke verwendbar sein.

[0049] Ferner kann zum Zeitpunkt eines Koronarangiogramms (oder eines digitalen Subtraktionsangiogramms) eine Injektion der Mikrokapseln Daten im Hinblick auf Gewebeperfusionseigenschaften liefern, die die aus dem Angiogrammverfahren erhaltenen Daten, die nur die Anatomie der Blutgefäße identifizieren, verstärken und ergänzen können.

[0050] Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Mikrokapseln können andere Nicht-Herzorgansysteme einschließlich der Leber, der Milz und der Niere, die derzeit durch Ultraschallverfahren abgebildet werden, zur Verstärkung derartiger derzeit erhältlicher Bilder und/oder zur Erzeugung neuer Bilder, die die Perfusion und Strömungseigenschaften, die bisher keiner Bildgebung unter Verwendung von Ultraschallbildgebungsverfahren des Standes der Technik zugänglich waren, geeignet sein.

[0051] Bevorzugte Aspekte der vorliegenden Erfindung werden nun durch Beispiele und unter Bezug auf Fig. 1, die eine teilweise weggeschnittene perspektivische Darstellung von vorne und von einer Seite einer geeigneten Sprühtrocknungsvorrichtung für die erste Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, beschrieben.

BEISPIEL 1

Sprühtrocknungseinrichtung

[0052] Ein geeigneter Sprühtrockner (Fig. 1) ist bei A/S Niro Atomizer, Soeborg, Dänemark, unter der Handelsbezeichnung "Mobile Minor" erhältlich. Der Sprühtrockner umfasst einen Behälter **1** für die Proteinlösung und eine Luftvorhangverteilvorrichtung **2**, die eine wirksame Steuerung des Luftstrommusters sicherstellt. Wirbelnde Luft wird in die Umgebung des Rotationszerstäubers oder Düsenzerstäubers **3** (beispielsweise des Typs M-02/B Minor), der durch eine Luftturbine mit einem Luftdruck von minimal 4,0 bar (4×10^5 Pa) und bis zu maximal 6,0 bar ($6{,}0 \times 10^5$ Pa) angetrieben wird, gelenkt. Bei 6,0 bar wird eine Zerstäubungsradgeschwindigkeit von etwa 33 000 $Umin^{-1}$ erreicht. Das An- und Abschalten der Pressluft für den Zerstäuber erfolgt mittels eines in der Instrumententafel **9** befindlichen Ventils. Der maximale Verbrauch an Pressluft für den Zerstäuber beträgt 17 Nm^3/h bei einem Druck von 6,0 bar. Alle mit der Flüssigkeitszufuhr und Pulver in Kontakt kommenden Teile bestehen aus rostfreiem Stahl AISI 316 mit Ausnahme des Pumpenzufuhrrohrs und des Zerstäuberrads, das aus rostfreiem Stahl AISI 329 besteht, damit es hoher Zentrifugalkraft widerstehen kann.

[0053] Die Maschine besitzt **5** Stufen für einen Zugang zum oberen Teil der Kammer und einen Schalter **6** für ein Luftventil zur Aktivierung einer pneumatischen Hebevorrichtung beim Heben des Kammerdeckels.

[0054] Die Trockenkammer besitzt ein aus rostfreiem Stahl AISI 316 gefertigtes Inneres, das mit Rockwool (registriertes Warenzeichen) gut isoliert ist und außen mit einer Weichstahlhülle umgeben ist. Die Abdeckung der Trockenkammer besteht innen aus rostfreiem Stahl AISI 316 und außen aus rostfreiem Stahl AISI 304.

[0055] Eine aus rostfreiem Stahl AISI 304 bestehende Luftverteilvorrichtung **2** wird zur Verteilung von Luft in der Trockenkammer verwendet, um den bestmöglichen Trocknungseffekt zu erreichen. Eine aus rostfreiem Stahl AISI 316 bestehende Luftleitung **4** sorgt für den seitlichen Transport der verbrauchten Luft und des Pulvers zum Zyklon **7**, der aus rostfreiem Stahl AISI 316 besteht und das Pulver und Luft trennen soll.

[0056] Ein ebenfalls aus rostfreiem Stahl AISI 316 bestehendes Schließventil des Schmetterlingsventiltyps mit einer Dichtung aus Siliconkautschuk wird zum Austrag des Pulvers unter dem Zyklon in einen direkt unter dem Zyklon mittels einer Federvorrichtung plazierten Pulversammelglastiegel **8** verwendet.

[0057] Ein aus Silumin bestehendes Zentrifugalabluftgebläse **10** mit einem dreiphasigen Käfigankermotor von 0,25 kW und einem V-Riemenantrieb mit Riemenschutz zieht Luft und Pulver durch die Trocknungskammer und den Zyklon. Eine Dämpfungsvorrichtung **11** steuert den Luftstrom.

[0058] Eine Luftheizvorrichtung **12** erhitzt die Trocknungsluft mittels Elektrizität (Gesamtverbrauch 7,5 kWh/h, unbegrenzt variabel) und sie kann Einlasslufttemperaturen von bis zu etwa 350°C ergeben, obwohl dies im allgemeinen für die Herstellung der erfindungsgemäßen Mikrokapseln zu hoch ist.

Verdampfungskapazitat

Trocknungsluft	Einlasslufttemperatur	Auslasslufttemperatur	Verdampfungskapazität
85 kg/h	150°C	80°C	1,3 kg/h
85 kg/h	170°C	85°C	1,7 kg/h
80 kg/h	200°C	90°C	2,5 kg/h
80 kg/h	240°C	90°C	3,4 kg/h
75 kg/h	350°C	90°C	7,0 kg/h

[0059] Eine aus rostfreiem Stahl AISI 316 bestehende Einrichtung für eine Zweiflüssigkeitendüsenzerstäubung kann hinzugefügt werden, wobei diese aus einem in der Decke der Trockenkammer zu plazierenden Eingangsrohr mit einem Düsenhalter und einer Düse besteht. Die Einrichtung umfasst einen Öl/Wasser-Separator, ein Reduzierventil und ein Druckmanometer für die Pressluft für die Zweiflüssigkeitendüse. Ver-Verbrauch an Pressluft: 8–15 kg/h bei einem Druck von 0,5–2,0 bar (0,5–2,0 × 10^5 Pa).

[0060] Eine geeignete Speisepumpe für den Transport von Material der wandbildenden Zubereitung zur Zerstäubungsvorrichtung ist eine peristaltische Pumpe. Die Pumpe ist mit einem Motor (1 × 220 V, 50 Hz, 0,18 kW) und einem kontinuierlich variablen Getriebe zur Handeinstellung ausgestattet. Eine aus einem Siliconschlauch bestehende Zufuhrleitung führt von einem Speisetank (lokale Zufuhr) durch die Speisepumpe zur Zerstäubungsvorrichtung.

[0061] Ein Reinluftfilter, das aus einem Vorfilter, einem Filterkörper aus rostfreiem Stahl und einem Reinluftfilter besteht, wird zur Behandlung der ankommenden Trocknungsluft verwendet, um diese vollständig rein zu machen.

Verfahren

[0062] Eine 10%ige (Gew./V) Lösung von sterilem pyrogenfreiem rHA in pyrogenfreiem Wasser (für Injektionszwecke) mit 25,0% (V/V) Ethanol wurde zur Düse eines Zweiflüssigkeitendüsenzerstäubers, der in der im vorhergehenden beschriebenen handelsüblichen Sprühtrocknungseinheit montiert ist, gepumpt. Die Geschwindigkeit der peristaltischen Pumpe wurde bei einer Rate von etwa 4,0 g/min derart gehalten, dass bei einer Einlasslufttemperatur von 220°C die Auslasslufttemperatur bei 95°C gehalten wurde.

[0063] Pressluft wurde der Zweiflüssigkeitenzerstäubungsdüse mit 2,0–6,0 bar (2,0–6,0 × 10^5 Pa) zugeführt. In diesem Bereich wurden Mikrokapseln mit einer mittleren Größe von 2,0–3,0 µm erhalten.

[0064] Typischerweise führte eine Zunahme der mittleren Teilchengröße (durch verringerten Zerstäubungsdruck) zu einer Zunahme der Menge von Mikrokapseln einer Größe von über 10 µm (s. Tabelle 1).

TABELLE 1

Wirkungen des Zerstäubungsdrucks auf die Häufigkeit von Mikrokapseln eines Durchmessers von über 10 μm

Zerstäubungsdruck (× 10^5 Pa)	Prozentuale Häufigkeit über 10 μm
6,0	0,8
5,0	3,0
3,5	6,6
2,5	8,6
2,0	13,1

[0065] Ein Druck von 5,0 × 10^5 Pa wurde zur Erzeugung der Mikrokapseln in diesem speziellen Beispiel verwendet.

[0066] In der zweiten Stufe des Verfahrens wurden 5 g Mikrokapseln in einem Becherglas unter Verwendung eines Gallenkamp-Gebläseofens erhitzt. Eine Temperatur von 175°C während 1 h war ausreichend, um Mikrokapseln mit 100 Fixierung zu erhalten, wie durch HPLC bestimmt wurde. Die Wirkung dieser Wärmefixierung bestand in der Erhöhung der in-vitro-echogenen Halbwertszeit von einigen Sekunden auf mehr als 30 min. Durch Veränderung der Temperatur und der Inkubationslänge kann der Fixierungsgrad zwischen etwa 5 und 100 variiert werden.

[0067] Nach der Wärmefixierung wurden die Mikrokapseln auf eine von zwei Arten desagglomeriert und in Wasser dispergiert. Das Verfahren 1 umfasste zunächst ein Mischen der wärmefixierten Kügelchen mit einem gleichen Gewicht von fein gemahlener Lactose (mittlerer Durchmesser 5 μm). Das Gemisch wurde dann durch eine Fritsch-Zentrifugenmühle mit einem 0,5-mm-Sieb und einem 12-Zahn-Rotor geschickt. Die gemahlenen Kügelchen wurden gesammelt und ein zweites Mal durch die Mühle geschickt, um sicherzustellen, dass ein vollständiges Mischen erfolgt ist. Das gemahlene Pulver wurde dann in Wasser, das 1 mg/ml Pluronic F68 (registriertes Warenzeichen) enthielt, resuspendiert. Typischerweise wurden 10 g Mikrokapseln und Lactose zu 100 ml Wasser und Pluronic F68 gegeben. Das Verfahren 2 zur Desagglomeration umfasst die Zugabe von 5 g der wärmefixierten Mikrokapseln zu 100 ml Wasser, das 100 mg Pluronic F68 enthielt. Die Mikrokapseln wurden unter Verwendung eines Silverson-Homogenisators (Modell L4R mit einer röhrenförmigen Homogenisierungssonde von 2,54 cm und einem Sieb mit starkem Scheren) dispergiert und 60 s homogenisiert.

[0068] Die resuspendierten Kügelchen wurden in inakte (gashaltige) und zerbrochene Kügelchen unter Verwendung eines Flotationsverfahrens getrennt. Die gashaltigen Kügelchen wurden während einer Zeitspanne von 1 h zur Oberfläche aufschwimmen gelassen und von der absinkenden Fraktion, die das erforderliche Gas nicht enthält, abdekantiert.

[0069] Das Trennverfahren kann durch Zentrifugieren beschleunigt werden. Eine Zentrifugation von 30 s mit 5000 × g ist zur Trennung der zwei Fraktionen ausreichend.

[0070] Anschließend an die Trennung wurden die intakten Mikrokapseln in Gegenwart von Lactose und Pluronic F68 gefriergetrocknet. Optimale Bedingungen zur Gefriertrocknung umfassten ein Resuspendieren von 30 mg Mikrokapseln in 5 ml Wasser, das 50 mg Lactose und 5 mg Pluronic F68 enthielt. Die gefriergetrockneten Mikrokapseln können in einer Flüssigkeit (beispielsweise Wasser, Kochsalzlösung) redispergiert werden, wobei eine monodisperse Verteilung erhalten wird.

BEISPIEL 2

[0071] Mikrokapseln wurden gemäß Beispiel 1, jedoch unter den im folgenden detailliert angegebenen Bedingungen hergestellt.

[0072] Eine 100 ± 10 mg/ml Lösung von sterilem pyrogenfreiem, von Serum stammendem humanem Albumin in pyrogenfreiem Wasser (zu Injektionszwecken) mit 25% (Gew./Gew.) Ethanol wurde als die Sprühtrocknungsstammlösung verwendet.

[0073] Unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe wurde die Albuminstammlösung mit einer Rate von 4

± 1,5 g/min derart gepumpt, dass bei einer Einlasstemperatur von 220 ± 0,5°C eine Auslasstemperatur von 80 ± 10°C beibehalten wurde.

[0074] Die weiteren Sprühtrocknungsbedingungen waren die folgenden: Luftstrom, 50 ± 2%; Zerstäubungsdruck, 8,0 ± 0,5 barg (8,0 ± 0,5 × 10^5 Pag); Trocknungsluftstrom, 9 ± 2 mm H_2O.

[0075] Die erzeugten Mikrokapseln wurden bei einer Temperatur von 176 ± 2°C während 55 ± 5 min in Aliquots von 5 ± 1 g in Bechern aus rostfreiem Stahl von 250 m l wärmefixiert.

[0076] Nach der Wärmefixierung wurden die Mikrokapseln desagglomeriert. Glucose wurde zu den gepoolten Mikrokapseln im Verhältnis 2:1 gegeben, vermischt und mit einer Glen Creston-Luftstrahlmühle gemahlen.

[0077] Die desagglomerierten Mikrokapseln wurden in Glasphiolen gefüllt und die Phiolen wurden mit Stickstoff gespült, verschlossen und mit einer Kappe versehen. Das Produkt wurde schließlich durch Bestrahlen mit einer Dosis von 25–35 kGy sterilisiert.

BEISPIEL 3

[0078] Test auf freies monomeres Albumin in Mikrokapseln Ein Volumen von 1 ml Ethanol wurde zu 100 mg Mikrokapseln in einer 20-ml-Glasflasche gegeben und 30 s lang ultraschallbehandelt. Zu dieser Suspension wurden 19 ml H_2O gegeben.

[0079] Das Gemisch wurde in einer Tischmikrozentrifuge (Gilson) 20 s lang zentrifugiert und die klare Fraktion wurde getestet. Der Test wurde durchgeführt, indem 50 ml Fraktion automatisch auf eine Shimadzu LC6A HPLC geladen wurden und auf einer TSK-Gelpermeationssäule mit einer Strömungsrate von 1 ml/min unter Verwendung von Natrimphosphatpuffer (pH-Wert 7,0) chromatographiert wurden.

[0080] Die Peakhöhen, die das HA-Monomer bedeuten, wurden aufgezeichnet und zur Bestimmung der Konzentration des Monomers unter Verwendung einer Standardkurve zwischen 1 und 10 mg/ml monomerem HA verwendet.

[0081] Der Prozentsatz von freiem monomerem HA wurde berechnet, indem die Monomerkonzentration in den fixierten Mikrokapseln gemessen und diese Zahl als Prozentsatz der Monomerkonzentration der nichtfixierten Mikrokapseln angegeben wurde.

[0082] Ein Erhitzen der sprühgetrockneten Mikrokapseln in einem Ofen (wie in Beispiel 1 beschrieben) führt zu einer Abnahme der Monomermenge, die nachgewiesen werden kann. Diese Abnahme von nachweisbarem monomerem HA beruht auf der Denaturierung und Vernetzung von monomerem HA in unlösliche Polymere, die durch das genannte HPLC-Verfahren nicht getestet werden können.

[0083] Unter Verwendung des HPLC-Verfahrens zum Testen der HA-Nachweiskonzentration ist klar, dass nach einer Inkubation von 15 min in den HA-Mikrokapseln kein freies monomeres HA vorhanden ist. Es ist jedoch noch möglich, die HA-Mikrokapseln durch Erhitzen während längerer Zeitspannen weiter zu vernetzen.

[0084] Dieses verlängerte Erhitzen führt zu einem erhöhten Grad der Mikrokapselvernetzung, was wiederum Mikrokapseln zunehmender Festigkeit, die gegenüber Druck entsprechend beständiger sind, erzeugt.

[0085] Durch eine sorgfältige Steuerung der Temperatur und Dauer der Inkubation können Mikrokapseln mit einem gesteuerten Bereich der Vernetzung (und damit der Druckbeständigkeit) erzeugt werden.

BEISPIEL 4

Mikrokapselklassifizierung

[0086] Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass die mittlere Größe und Größenverteilung der Mikrokapseln gesteuert werden kann. Jedoch können die gewünschten Größen nach Wunsch, beispielsweise durch Flotation, weiter selektiert werden. In einer homogenen Dispersion von Mikrokapseln steigen größere Teilchen aufgrund der geringeren Dichte (mehr eingekapselte Luft) der größeren Teilchen schneller als kleinere Teilchen zur Oberfläche. Daher ändert sich, wenn die Dispersion stehengelassen wird, die Teilchengrößenverteilung im Hinblick auf die Zeit in jeder Höhe der Lösung.

[0087] Mikrokapseln wurden in 2000 ml einer wässrigen Lösung, die 6% (Gew./V) Natriumchlorid und 0,1% (Gew./V) Pluronic F68 (registriertes Warenzeichen) enthielt, in einer Glasflasche dispergiert, wobei eine Flüssigkeitssäule von etwa 165 mm erhalten wurde. Ein Probenröhrchen wurde 50 mm unter der oberen Flüssigkeitsoberfläche plaziert, um eine Probenentnahme in zeitlichen Abständen zu ermöglichen.

[0088] Durch Verändern der Standzeit und der Natriumchloridkonzentration konnten eine Vielzahl von Teilchengrößenverteilungen erzeugt und Mikrokapseln bis zu 2 µm klassifiziert werden.

[0089] Andere Nassverfahren der Klassifizierung umfassen hydrodynamische Chromatographie und Feldströmungsfraktionierung. "Trockene" Verfahren, die die Prinzipien der Schlämmanalyse und Querströmungstrennung verwenden, sind im Handel in der Form von Microsplit (British Rem.)-, Zig-zag (Alpine)- und Turbo (Nissuin)-Klassifiziervorrichtungen erhältlich.

BEISPIEL 5

Charakterisierung von Mikrokapseln mit humanem Serumalbumin

[0090] Es zeigte sich, dass die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten hohlen Mikrokapseln derart sind, dass die bei der Herstellung verwendete Menge des wandbildenden Materials aufgrund der kleineren mittleren Größe und Verbesserungen der Hülleigenschaften beträchtlich geringer als die bei früheren Herstellungsverfahren verwendete ist. Jedoch ist die Echogenität der Mikrokapseln trotzdem gegenüber den früher hergestellten hervorragend. Diese neue Eigenschaft wird als Decibel (dB) der Echogenität pro µg/ml Albumin ermittelt und ausgedrückt. Die Echogenität kann als die Fähigkeit eines Materials zur Reflexion oder "Zurückstreuung" von Ultraschallwellen definiert werden. Die Intensität der Zurückstreuung wird durch Bildanalyse in Form von Decibel quantitativ erfasst. Je größer die Intensität des Signals ist, desto echogener ist die Probe.

[0091] Das gesamte für den Test verwendete Wasser war pyrogenfrei und wurde zwei Tage vor der Verwendung gezapft, wobei es durch Einwirken von Luft entgasen konnte.

[0092] In einen 400-ml-Polypropylentestbecher (Fisons Scientific Equipment, UK) wurden 350 ml Wasser gegeben und etwaige Luftblasen wurden vor der Verwendung an die Oberfläche steigen gelassen.

[0093] Ein Ultraschallgerät Hewlett Packard Sonos 1000 wurde verwendet und die Kontrollen wurden wie folgt gesetzt: TGC (Gesamtverstärkungskontrolle) #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, insgesamt = 128; Kompression = 128 dB; und Transmission = 60 dB. Ein 3,5-MHz-Sensor wurde mit einer Tiefeneinstellung von 8 cm verwendet.

[0094] Der Sensor wurde in einer Tiefe von 1,5 cm in das Wasser eingeführt und die magnetische Folgevorrichtung wurde auf 75 Drehungen/min eingestellt. Eine Hintergrundaufzeichnung der Rückstrahlungsintensität erfolgte am Anfang. Ein Bildanalysator (Seescan, Cambridge, UK) wurde zur Aufzeichnung der Ultraschallabtastung während 1,2 s und anschließenden Aufteilung der Aufzeichnung in 10 zeitliche Einzelbilder verwendet. Jedes Bild wurde hinsichtlich Rückstreuungsintensität analysiert und die statistischen Ergebnisse wurden berechnet.

[0095] Ein homogenes Volumen suspendierter Mikrokapseln wurde unter Vermeidung der Einführung von Luftblasen vorsichtig hinzugegeben. Das zugegebene Volumen war derart, dass nach der Verabreichung die Mikrokapselkonzentration in der Ultraschalltestzelle 1×10^6/ml betrug. Die Mikrokapseln wurden sich gleichmäßig im Wasser verteilen gelassen, bevor eine Echtzeitultraschallabtastung unter Verwendung des Bildanalysators "aufgenommen" und die Rückstrahlungsintensität gemessen wurde.

[0096] Das Ultraschallgerät wurde unter Bezug auf einen Reflektor aus rostfreiem Stahl und eine Reihe von zunehmend echoreflektierenden Siliconkautschukblöcken, die Gewebe nachahmen, die von ATS Laboratories Inc., Bridgeport, CT 06608, USA, erhalten wurden, geeicht. Eine Eichkurve wurde gezeichnet und die anschließenden Messungen von Videoanzeigeeinheiten, die unten bestimmt wurden, wurden aus der erzeugten Eichkurve in dB wieder umgewandelt. Der Test wurde dreimal wiederholt und die mittlere Intensitätsmessung wurde berechnet.

[0097] Der Proteingehalt der Mikrokapseln mit humanem Serumalbumin wurde unter Verwendung eines modifizierten Kjeldahl-Tests bestimmt. Der Test bestimmt den Stickstoffgehalt einer Mikrokapselprobe, der dann in Form der Gesamtproteinkonzentration berechnet wird; aus diesem Ergebnis kann das Protein einer fixierten

Zahl von Mikrokapseln und insbesondere der Proteingehalt der zu dem Echogentest gegebenen Probe berechnet werden.

[0098] Die Mikrokapseln wurden unter Verwendung eines Tecator Digestion System 12 verdaut, wobei jegliches in der Probe vorhandene Kohlehydrat durch Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Jegliches Protein und daher der vorhandene Stickstoff wird während der Verdauung in Ammoniumsulfat umgewandelt. Dies wird umgekehrt durch Dampfdestillation unter alkalischen Bedingungen in Ammoniak umgewandelt. Das freigesetzte Ammoniak wird kondensiert, in Borsäure absorbiert und die absorbierte Menge wird durch Titration mit Salzsäure bestimmt. Dieses Verfahren wurde unter Verwendung eines Kjeltec Auto 1030-Analysators automatisiert. Unter Verwendung geeigneter Standards kann die Menge des in einer Probe vorhandenen Proteins berechnet werden.

[0099] Aus der Gesamtproteinanalyse wurde die zu der Echogenitätstestzelle gegebene Proteinmenge bestimmt. Die Zahl der verabreichten Mikrokapseln wurde als Gewicht des zugegebenen Proteins berechnet und deshalb wurde die Echogenität pro µg/ml Mikrokapseln bestimmt.

TABELLE 2 Echogenität gegen Gewicht der Mikrokapseln

Charge Nr.	Echogenität (VDU)	Konzentration der zugegebenen Mikrokapseln (µg/ml)	Gesamte VDU µg/ml Mikrokapseln
AIP101/941	26	13,23	1,97
AIP101/942	26	12,29	2,11
AIP101/943	25	13,80	1,92
AIP101/944	26	12,47	2,09
Ergebnismittelwert	-	-	2,023 ± 0,09

Charge Nr.	Echogenität (dB)	Gewicht der zugegebenen Mikrokapseln (µg/ml)
AIP101/941	–7,4	13,23
AIP101/942	–7,4	12,29
AIP101/943	–7,3	13,80
AIP101/944	–7,4	12,47
Ergebnismittelwert	-	-

BEISPIEL 6

[0100] Optimierung der Sprühtrocknungsbedingungen zur Maximierung der Anzahl intakter gashaltiger Teilchen Wir beschreiben im vorhergehenden die Herstellung glatter, kugelförmiger und hohler Mikroteilchen zur Verwendung bei der Echokontrastbildgebung. Es ist günstig, die Anzahl von Teilchen von größer als 6 µm zu minimieren und die Zahl von gashaltigen hohlen Teilchen zu maximieren. Eine Reihe von Experimenten wurde unter den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, um den Einfluss der Flüssigkeitszufuhrrate auf die Ausbeute an intakten kugelförmigen Teilchen zu prüfen. Wir ermittelten, dass eine Erhöhung der Flüssigkeitszufuhrrate die Zahl von während der Anfangssprühtrocknung gebildeten intakten Mikroteilchen verminderte (Tabelle 4). Die mittlere Teilchengröße und die Gesamtdruckstabilität, d. h. die Dicke der Hülle, verändern sich nicht, jedoch verändert sich die Gesamtechogenität, wenn die Flüssigkeitsströmungsrate von 4 auf 16 ml/min erhöht wird. Wir ermittelten, dass langsamerere Verdampfungsraten (bei höheren Flüssigkeitsströmungsraten) zur Bildung von weniger intakten gashaltigen Teilchen führten.

TABELLE 4

Strömungsraten (ml/min)	4	8	12	16
Mittlere Größe (µm)	3,08	3,04	3,13	3,07
Echogenität (Videodichteeinheiten)	22	21	14	10
Echogenität nach Druck (Videodichteeinheiten)	20	18	10	8

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bildung von Mikrokapseln durch
(i) Bereitstellen einer Lösung eines Materials in einem wässrigen Lösemittel und
(ii) Sprühen der Lösung in ein Gas derart, dass das wässrige Lösemittel verdampft, wodurch hohle Mikrokapseln gebildet werden,
dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung eine Flüssigkeit einer größeren Flüchtigkeit als Wasser enthält.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die flüchtige Flüssigkeit einen Siedepunkt aufweist, der bei atmosphärischem Druck zwischen 20°C und 100°C liegt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die flüchtige Flüssigkeit Ethanol oder Methanol ist.

4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die flüchtige Flüssigkeit 0,1–80,0 Vol.-% der wässrigen Lösung ausmacht.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die flüchtige Flüssigkeit 5,0–30,0 Vol.-% der wässrigen Lösung ausmacht.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Material ein Protein ist.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei das Protein Albumin, Kollagen oder Gelatine ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei das Protein Albumin ist.

9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Materialkonzentration in der Lösung 1,0–25,0% (Gew./V.) beträgt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die Materialkonzentration in der Lösung 5,0–15,0% (Gew./V.) beträgt.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lösung zusätzlich ein Röntgenkontrastmittel oder ein Kernresonanzbildgebungskontrastmittel umfasst.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mikrokapseln vor der Verwendung, beispielsweise durch Wärmebehandlung, um die Mikrokapseln stärker unlöslich zu machen, oder durch Bestrahlung zur Sterilisierung der Mikrokapseln, weiter behandelt werden.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verfahren so durchgeführt wird, dass ein steriles, intravenös injizierbares Produkt erhalten wird.

14. Mikrokapseln, die durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 erhältlich sind.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung, die sterile trockene Mikrokapseln gemäß Anspruch 14 in einer verschlossenen Phiole umfasst.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung, die sterile Mikrokapseln gemäß Anspruch 14 in Suspension in

einem sterilen, intravenös injizierbaren Medium umfasst.

17. Verfahren zur Bereitstellung eines Bildes von einem Teil eines Menschen- oder Tierpatienten durch
(i) Einführen von Mikrokapseln gemäß Anspruch 14 in den Patienten,
(ii) Einwirkenlassen von Strahlung auf den Patienten und
(iii) Erzeugen eines Bildes auf der Grundlage der Reflektivität, Durchlässigkeit oder Resonanz der Mikrokapseln in dem Teil des Patienten.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

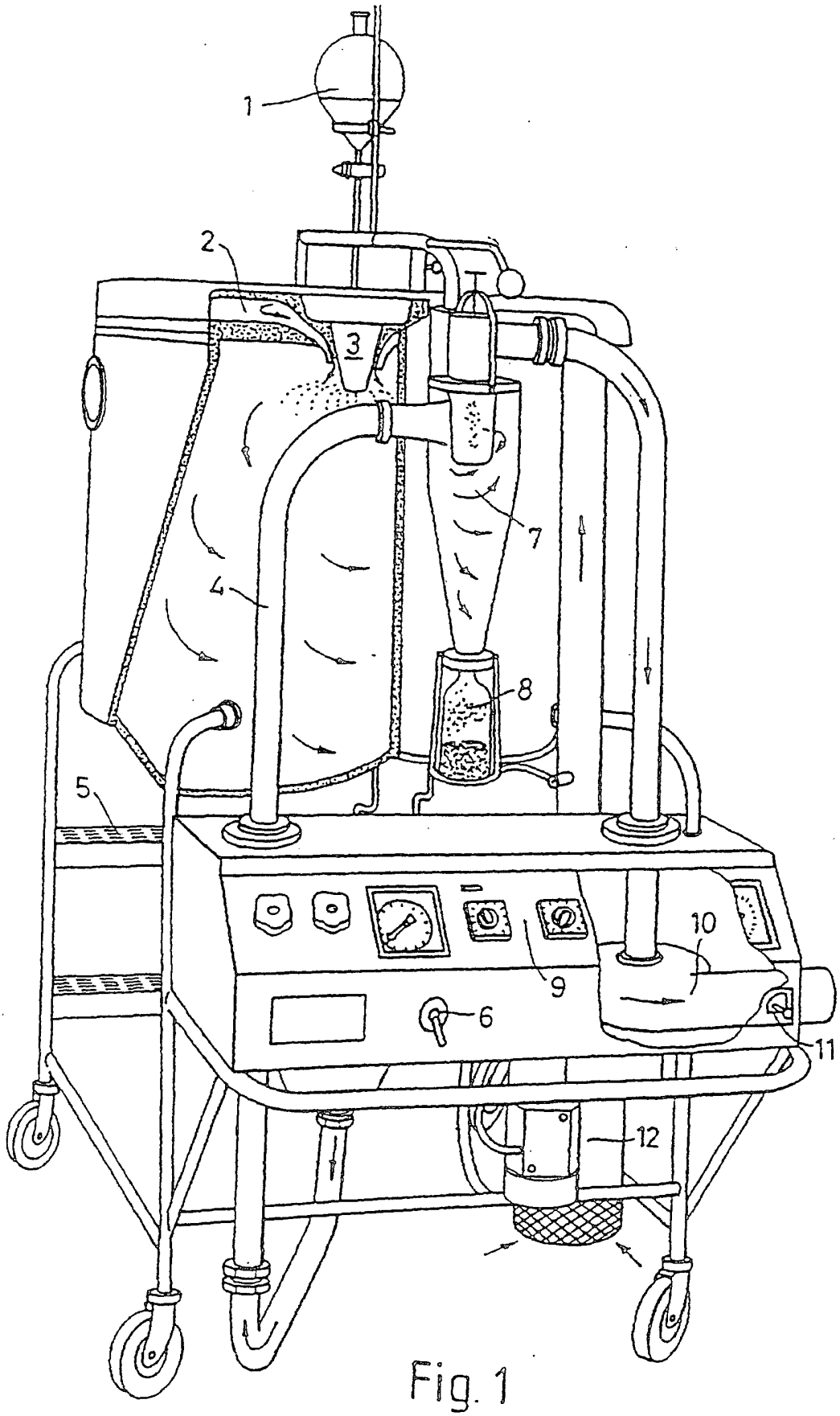


Fig. 1