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

(10) **DE 694 33 723 T3** 2008.10.30

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 693 924 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 723.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/01985**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 909 778.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/018954**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.02.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **01.09.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.01.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.04.2004**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **09.04.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.10.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 9/48*** (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

23698	**22.02.1993**	**US**
35150	**26.03.1993**	**US**

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

(73) Patentinhaber:
Abraxis Bioscience, Inc., Los Angeles, Calif., US

(74) Vertreter:
Fiener, J., Pat.-Anw., 87719 Mindelheim

(72) Erfinder:
GRINSTAFF, Mark W., Pasadena, US; SOON-SHIONG, Patrick, Los Angeles, US; WONG, Michael, Champagne, US; SANDFORD, Paul A., Los Angeles, US; SUSLICK, Kenneth S., Champagne, US; DESAI, Neil P., Los Angeles, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN FÜR DIE IN-VIVO-VERABREICHUNG VON BIOLOGISCHEN SUBSTANZEN UND HIERFÜR VERWENDBARE ZUSAMMENSETZUNGEN**

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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die In-vivo-Verabreichung von biologischen Substanzen. Gemäß einem Aspekt ist die biologische Substanz mit einer polymeren Hülle verbunden, die aus einem biokompatiblen Material zubereitet ist. Die biologische Substanz kann mit der polymeren Hülle selbst verbunden sein, und/oder die in einem nichtwässrigen biokompatiblen Dispergierungsmittel suspendierte/dispergierte biologische Substanz kann von der polymeren Hülle umschlossen sein. Gemäß einem anderen Aspekt wird die mit der polymeren Hülle verbundene biologische Substanz einem Patienten verabreicht, wahlweise in einer geeigneten biokompatiblen Flüssigkeit dispergiert.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Im Blut vorhandene Mikropartikel und Fremdkörper werden im Allgemeinen von den "Blut-Filtrierorganen", nämlich der Milz, den Lungen und der Leber, aus dem Kreislauf entfernt. Das im normalen Vollblut enthaltene partikuläre Material umfasst rote Blutzellen (typischerweise mit einem Durchmesser von 8 μm), weiße Blutzellen (typischerweise mit einem Durchmesser von 6–8 μm) und Plättchen (typischerweise mit einem Durchmesser von 1–3 μm). Die Mikrozirkulation in den meisten Organen und Geweben erlaubt die freie Passage dieser Blutzellen. Wenn Mikrothromben (Blutgerinsel) von Abmessungen größer als 10–15 μm im Kreislauf vorhanden sind, hat dies das Risiko von Infarkt oder Verstopfung der Kapillargefäße zur Folge, was zu Ischämie oder Sauerstoffentzug und möglichem Absterben von Gewebe führt. Daher muss die Injektion von Partikeln mit einem Durchmesser von mehr als 10–15 μm in den Kreislauf verhindert werden. Eine Suspension von Partikeln mit weniger als 7–8 μm ist jedoch verhältnismäßig sicher und wurde zur Zuführung von pharmakologisch wirksamen Mitteln in Form von Liposomen und Emulsionen, Nahrungsmitteln und Kontrastmitteln für bildgebende Anwendungen verwendet.

[0003] Die Größe von Partikeln und ihre Art der Zuführung bestimmt ihr biologisches Verhalten. Strand et al. [in Microspheres-Biomedical Applications, Hrsg. A. Rembaum, S. 193–227, CRC Press (1988)] haben das Schicksal von Partikeln als von ihrer Größe abhängig beschrieben. Partikel im Größenordnungsbereich von wenigen Nanometern (nm) bis 100 nm dringen nach interstitieller Injektion in die lymphatischen Kapillaren ein, und eine Phagozytose kann innerhalb der Lymphknoten stattfinden. Nach intravenöser/intraarterieller Injektion werden Partikel, die kleiner als ungefähr 2 μm sind, durch das retikuloendotheliale System (RES), auch bekannt als mononukleäres Phagozyten-System (MPS), schnell aus dem Blutstrom entfernt. Partikel, die größer als ungefähr 7 μm sind, werden nach intravenöser Injektion in den Lungen-Kapillaren eingeschlossen. Nach intraarterieller Injektion werden Partikel in dem ersten Kapillarbett eingeschlossen, das sie erreichen. Inhalierte Partikel werden von den Alveolarmakrophagen eingeschlossen.

[0004] Wasserunlösliche oder schlecht wasserlösliche und auf die sauren Umgebungen im Magen empfindlich reagierende Pharmazeutika können nicht konventionell (z. B. durch intravenöse Injektion oder orale Eingabe) verabreicht werden. Die parenterale Verabreichung solcher Pharmazeutika wurde erreicht durch Emulgierten von in Öl löslich gemachtem Arzneimittel mit einer wässrigen Flüssigkeit (wie normale Salzlösung) bei Vorhandensein von oberflächenaktiven Substanzen oder Emulsions-Stabilisatoren, um stabile Mikro-Emulsionen herzustellen. Diese Emulsionen können intravenös injiziert werden, vorausgesetzt, die Komponenten der Emulsion sind pharmakologisch wirkungslos. Zum Beispiel beschreibt das US-Patent Nr. 4,073,943 die Verabreichung von wasserunlöslichen, pharmakologisch wirksamen, in Ölen gelösten und mit Wasser emulgierten Mitteln bei Vorhandensein von oberflächenaktiven Substanzen, wie Ei-Phosphatiden, Pluronics (Copolymere von Polypropylenglykol und Polyethylenglykol), Polyglycerololeat usw. Die internationale PCT-Veröffentlichung WO 85/00011 beschreibt pharmazeutische Mikrotröpfchen eines mit einem Phospholipid wie Dimyristoyl-Phosphatidylcholin überzogenen Anästhetikums, das geeignete Abmessungen zur intradermalen oder intravenösen Injektion hat.

[0005] Über Protein-Mikrokugeln ist in der Literatur als Träger von pharmakologischen oder diagnostischen Mitteln berichtet worden. Mikrokugeln aus Albumin sind sowohl durch Denaturation mittels Hitze als auch durch chemische Vernetzung hergestellt worden. Mittels Hitze denaturierte Mikrokugeln werden aus einer emulgierten Mischung (z. B. Albumin, das einzuschließende Mittel, und ein geeignetes Öl) bei Temperaturen zwischen 100°C und 150°C hergestellt. Die Mikrokugeln werden dann mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen und gelagert. Leucuta et al. [International Journal of Pharmaceutics Bd. 41: 213–217 (1988)] beschreiben das Verfahren der Herstellung von mittels Hitze denaturierten Mikrokugeln.

[0006] Das Verfahren zur Herstellung chemisch vernetzter Mikrokugeln schließt die Behandlung der Emulsion mit Glutaraldehyd ein, um das Protein zu vernetzen, gefolgt von Waschen und Lagern. Lee et al. [Science Bd. 213: 233–235 (1981)] und das US-Patent Nr. 4,671,954 lehren dieses Herstellungsverfahren.

[0007] Die obigen Arbeitsverfahren zur Herstellung von Protein-Mikrokugeln als Träger von pharmakologisch aktiven Mitteln sind ungeeignet für den Einschluss von wasserunlöslichen Mitteln, obwohl sie zur Zufuhr von wasserlöslichen Mitteln geeignet sind. Diese Einschränkung wohnt dem Herstellungsverfahren inne, das auf der Vernetzung oder Hitze-Denaturation der Proteinkomponente in der wässrigen Phase einer Wasser-in-Öl-Emulsion beruht. Jedes wasserlösliche Mittel, das in der Protein enthaltenden wässrigen Phase gelöst ist, kann in der entstehenden vernetzten oder mittels Hitze denaturierten Proteinmatrix eingeschlossen sein, aber ein kaum wasserlösliches oder kaum öllösliches Mittel kann nicht in eine mittels dieser Verfahren hergestellte Proteinmatrix eingeschlossen werden.

[0008] Somit stellt die mangelhafte Wasserlöslichkeit vieler biologischer Substanzen ein Problem für die Verabreichung an Menschen dar. Tatsächlich kann die Zufuhr von schon an sich unlöslichen oder kaum in wässrigem Medium löslichen pharmakologisch wirksamen Mitteln stark beeinträchtigt werden, falls die orale Zufuhr nicht wirksam ist. Dementsprechend bedürfen derzeit angewandte Rezepturen zur Zufuhr von pharmakologisch wirksamen Mitteln, die schon an sich unlöslich oder kaum in wässrigem Medium löslich sind, der Zugabe von Mitteln, um die pharmakologisch wirksamen Mittel löslich zu machen. Häufig werden allerdings schwerwiegende allergische Reaktionen von den Mitteln (z. B. Emulgatoren) verursacht, die verwendet werden, um die pharmakologisch wirksamen Mittel löslich zu machen. Somit erfordert ein übliches Applikationsregime die Behandlung des Patienten mit Antihistaminika und Steroiden, bevor das pharmakologisch wirksame Mittel injiziert wird, um die allergischen Nebenwirkungen der angewandten Mittel zu vermindern und die Arzneimittelzufuhr zu unterstützen.

[0009] In dem Bemühen, die Wasserlöslichkeit von Arzneimitteln zu verbessern, die in wässrigem Medium an sich unlöslich oder kaum löslich sind, haben etliche Forscher die Struktur von Arzneimitteln mit funktionellen Gruppen, die eine verbesserte Wasserlöslichkeit verleihen, chemisch verändert. Unter den im Stand der Technik beschriebenen chemischen Modifikationen befinden sich die Herstellung von sulfurierten Derivaten [Kingston et al., US-Patent 5,059,699 (1991)] und Aminosäureestern [Mathew et al., J. Med. Chem. Bd. 35: 145–151 (1992)], die eine signifikante biologische Wirksamkeit zeigen. Modifikationen, um wasserlösliche Derivate zu erzeugen, erleichtern die intravenöse Gabe von Arzneimitteln, die an sich unlöslich oder kaum löslich sind, in wässrigem Medium (gelöst in einem unschädlichen Träger, wie normale Salzlösung). Solche Modifikationen kommen jedoch zu den Herstellungskosten der Arzneimittel hinzu, können unerwünschte Nebenwirkungen und/oder allergische Reaktionen hervorrufen und/oder können die Wirksamkeit des Arzneimittels herabsetzen.

[0010] Zusätzliche biologische Substanzen, die meist in einem wässrigen Medium an sich unlöslich oder kaum löslich sind und für die es wünschenswert ist, sie in einem unschädlichen Träger, wie normaler Salzlösung, gelöst zu verabreichen, während sie einem Minimum an unerwünschten Nebenwirkungen und/oder allergischen Reaktionen Vorschub leisten, sind Diagnosemittel, wie z. B. Kontrastmittel. Kontrastmittel sind bei radiologischer Bildgebung erwünscht, da sie die Sichtbarmachung von Organen (d. h. ihre Lage, Größe und räumliche Anordnung) und anderen Zellstrukturen vor dem umgebenden Medium verbessern. Die Weichteile zum Beispiel haben eine ähnliche Zellzusammensetzung (d. h. sie bestehen vorwiegend aus Wasser), wenn sie auch bemerkenswert unterschiedliche biologische Funktionen haben (z. B. Leber und Bauchspeicheldrüse).

[0011] Das Verfahren der Magnet-Resonanz-Darstellung (MRI) oder Kernspinresonanz-(NMR-)Darstellung beruht auf dem Nachweis bestimmter Atomkerne bei einer angelegten Magnetfeldstärke unter Anwendung von Radiofrequenzstrahlung. In mancher Hinsicht ist es der Röntgen-Computertomographie (CT) ähnlich, dahingehend, dass es (in manchen Fällen) Querschnittsabbildungen von Organen mit einer möglicherweise ausgezeichneten Weichteilauflösung liefern kann. In seiner gegenwärtigen Nutzung erstellen die Bilder eine Verteilungskarte von Protonen in Organen und Geweben. Jedoch verwendet MRI, anders als eine Röntgen-Computertomographie, keine ionisierende Strahlung. MRI ist daher ein sicheres, nichtinvasives Verfahren zur medizinischen Bildgebung.

[0012] Obwohl das NMR-Phänomen im Jahr 1954 entdeckt wurde, hat es in der medizinischen Diagnostik dennoch erst kürzlich als Mittel zur Kartierung innerer Strukturen Verwendung gefunden. Das Verfahren wurde zuerst von Lauterbur entwickelt [Nature 242: 190–191 (1973)].

[0013] Es ist wohl bekannt, dass sich Kerne mit dem passenden Kernspin in Richtung des angelegten Mag-

netfeldes ausrichten. Der Kernspin kann in jeder von zwei verschiedenen Arten ausgerichtet werden: mit oder gegen das äußere Magnetfeld. Die Ausrichtung mit dem Feld ist stabiler; wohingegen Energie absorbiert werden muss, um sich im weniger stabilen Zustand auszurichten (d. h. gegen das angelegte Feld). Falls es sich um Protonen handelt, präzedieren oder resonieren diese Kerne bei einer Frequenz von 42,6 MHz bei Vorhandensein eines Magnetfeldes von 1 Tesla (1 Tesla = 10^4 Gauß). Bei dieser Frequenz erregt ein Hochfrequenz-(HF-)Strahlungsimpuls die Kerne und ändert ihre Spin-Orientierung, damit sie sich gegen das angelegte Magnetfeld ausrichten. Nach dem HF-Impuls "entspannen" die erregten Kerne oder kehren zum Äquilibrium oder der Ausrichtung mit dem Magnetfeld zurück. Die Abnahme des Relaxationssignals kann unter Verwendung von zwei Relaxationstermen beschrieben werden. T_1, die Spin-Gitter-Relaxationszeit oder Longitudinalrelaxationszeit, ist die Zeit, die von den Kernen benötigt wird, um zum Äquilibrium entlang der Richtung des von außen angelegten Magnetfeldes zurückzukehren. Die zweite, T_2 oder Spin-Spin-Relaxationszeit, ist mit dem Verschieben der anfänglich kohärenten Präzession einzelner Protonen-Spins verbunden. Die Relaxationszeiten für verschiedene Flüssigkeiten, Organe und Gewebe in unterschiedlichen Arten von Säugetieren sind sehr gut dokumentiert.

[0014] Ein Vorteil von MRI ist, dass unterschiedliche Abtastebenen und Schnittdicken ohne Verluste bei der Auflösung ausgewählt werden können. Dies erlaubt, dass qualitativ hochwertige transversale, koronale und sagittale Bilder direkt gewonnen werden. Das Fehlen jeglicher mechanischer beweglicher Teile in der MRI-Ausrüstung fördert einen hohen Zuverlässigkeitsgrad. Es wird allgemein angenommen, dass die MRI bei der selektiven Untersuchung von Geweben ein höheres Potential hat als die Röntgen-Computertomographie (CT). In der CT bestimmen allein die Koeffizienten der Röntgenstrahlenabschwächung die Bildschärfe, während mindestens drei separate Variablen (T_1, T_2 und die Kernspin-Dichte) am Magnetresonanzbild mitwirken.

[0015] Aufgrund feiner physio-chemischer Unterschiede zwischen Organen und Geweben kann die MRI Gewebetypen unterscheiden und Erkrankungen wahrnehmen, die möglicherweise von Röntgenstrahlen oder CT nicht wahrgenommen werden können. Im Vergleich reagieren CT und Röntgenstrahlen nur empfindlich auf Unterschiede der Elektronendichte in Geweben und Organen. Die mittels MRI-Verfahren erhältlichen Bilder können einen Arzt auch in die Lage versetzen, wegen ihrer besseren räumlichen Auflösung Strukturen wahrzunehmen, die kleiner sind als die mittels CT wahrgenommenen. Zusätzlich kann jede Bildabtastebene, einschließlich transversal, koronal und sagittal, unter Verwendung von MRI-Verfahren leicht erhalten werden.

[0016] Derzeit wird MRI verbreitet zur Unterstützung bei der Diagnose vieler medizinischer Störungen genutzt. Beispiele schließen ein: Gelenkschäden, Knochenmarksstörungen, Tumoren der Weichteile, Mediastinalinvasion, Lymphadenopathie, kavernöses Hämangiom, Hämochromatose, Zirrhose, Nierenzellkarzinom, uterines Leiomyom, Adenomyose, Endometriose, Mammakarzinome, Stenose, koronare Arterienerkrankung, Aortendissektion, lipomatöse Hypertrophie, Vorhofseptum, konstriktive Perikarditis und dergleichen [siehe z. B. Edelman & Warach, Medical Progress 328: 708–716 (1993); Edelman & Warach, New England J. of Medicine 328: 785–791 (1993)].

[0017] Routinemäßig angewandte Magnet-Resonanz-Bilder basieren derzeit auf Protonen-Signalen, die aus den Wassermolekülen innerhalb der Zellen hervorgehen. Folglich ist es oft schwierig, die Bilder zu entziffern und einzelne Organe und Zellstrukturen zu unterscheiden. Es gibt zwei mögliche Mittel, um Protonensignale besser zu unterscheiden. Das erste schließt die Verwendung eines Kontrastmittels ein, das T_1 oder T_2 der Wassermoleküle in einem Bereich im Vergleich zu einem anderen verändert. Zum Beispiel verkürzt Gadolinium-Diethylentriaminpenta-Essigsäure (Gd-DTPA) die Protonen-T_1-Relaxationszeit der sich in der Nähe dazu befindlichen Wassermoleküle, wodurch die gewonnenen Bilder verbessert werden.

[0018] Der zweite Weg zur Unterscheidung einzelner Organe und zellulärer Strukturen ist, einen anderen Kern für die Bildgebung einzuführen (d. h. ein bildgebendes Mittel). Bei der Anwendung dieser zweiten Vorgehensweise kann die Bildgebung nur dort stattfinden, wo das Kontrastmittel hingebracht wurde. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die Tatsache, dass die Bildgebung ohne Beeinträchtigung durch das umgebende Wasser erreicht wird. Geeignete Kontrastmittel müssen biokompatibel (d. h. nicht toxisch, chemisch stabil, nicht mit Geweben reagierend) und vor Ausscheidung aus dem Körper von begrenzter Lebensdauer sein.

[0019] Obwohl Wasserstoff typischerweise als Grundlage für die MRI-Abtastung ausgewählt worden ist (wegen seiner Häufigkeit im Körper), kann dies wegen fehlendem Kontrast schwach dargestellte Bereiche zur Folge haben. Folglich kann daher die Verwendung anderer aktiver MRI-Nuklei (wie z. B. Fluor) vorteilhaft sein. Die Verwendung bestimmter Perfluorkohlenstoffe in verschiedenen diagnostischen Bildgebungstechnologien wie Ultraschall, Magnet-Resonanz, Radiographie und Computertomografie ist in einem Artikel von Mattery [siehe SPIE, 626, XIV/PACS IV, 18–23 (1986)] beschrieben worden. Die Verwendung von Fluor ist vorteilhaft,

da Fluor nicht natürlicherweise im Körper gefunden wird.

[0020] Vorschläge des Standes der Technik von Fluor enthaltenden Verbindungen, die für die Magnet-Resonanz-Bildgebung für medizinische Diagnosezwecke nützlich sind, sind begrenzt auf eine ausgewählte Gruppe von Fluor enthaltenden Molekülen, die wasserlöslich sind oder Emulsionen bilden können. Dementsprechend leidet die Verwendung von Fluorkohlenstoff-Emulsionen wasserlöslicher Fluorkohlenstoffe des Standes der Technik unter zahlreichen Nachteilen, z. B.:

1) Verwendung instabiler Emulsionen,
2) Fehlen von Organspezifität und Ausrichtung auf das Organ,
3) Potential zur Induktion allergischer Reaktionen aufgrund der Verwendung von Emulgatoren und oberflächenaktiven Substanzen (z. B. Ei-Phosphatide und Eidotter-Lecithin),
4) begrenzte Lieferkapazitäten, und
5) wasserlösliche Fluorkohlenstoffe werden nach der intravenösen Injektion schnell in Blut verdünnt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0021] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung werden Zusammensetzungen, die bei der In-vivo-Verabreichung von biologischen Substanzen nützlich sind, in Form von Mikropartikeln zur Verfügung gestellt, die zur parenteralen Applikation in wässriger Suspension geeignet sind. Zusammensetzungen der Erfindung umfassen biologische Substanzen (als Feststoff oder Flüssigkeit) in Verbindung mit einer polymeren Hülle. Die polymere Hülle ist ein biokompatibles Material, vernetzt durch das Vorhandensein von Disulfidbindungen. Die Verwendung der Zusammensetzungen der Erfindung zur Verabreichung von biologischen Substanzen beseitigt die Notwendigkeit der Anwendung biologischer Substanzen in einer Emulsion, die z. B. Ethanol und polyethoxyliertes Rizinusöl, verdünnt in normaler Salzlösung, enthält (siehe zum Beispiel Norton et al., in Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop an Taxol & Taxus, 23–24. September 1992). Ein Nachteil solcher bekannter Zusammensetzungen ist ihre Neigung, allergische Nebenwirkungen hervorzurufen.

[0022] Entsprechend einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Verfahren zum Einschluss von biologischen Substanzen in eine polymere Hülle zur Verfügung gestellt.

[0023] Die Verabreichung von biologischen Substanzen in Form einer Mikropartikel-Suspension erlaubt einen gewissen Grad der erzielten Wirkstofffreisetzung an Organen wie Leber, Lungen, Milz, Lymphkreislauf und dergleichen durch die Verwendung von Partikeln verschiedener Größe und durch Verabreichung auf unterschiedlichen Wegen. Das Verfahren der Erfindung zur Verabreichung erlaubt ferner die Verabreichung von biologischen Substanzen, wie im Wesentlichen wasserunlösliche pharmakologisch wirksame Mittel, die ein viel geringeres Flüssigkeitsvolumen verwenden und eine beträchtlich verminderte Verabreichungszeit benötigen, verglichen mit den Verabreichungsvolumina und -zeiten, die von Verabreichungssystemen im Stand der Technik benötigt werden (z. B. werden intravenöse Infusionen von ungefähr ein bis zwei Litern Flüssigkeit über einen Zeitraum von 24 Stunden benötigt, um eine typische Human-Dosis von 200–400 mg Taxol zu verabreichen).

[0024] Die vorliegende Erfindung überwindet die Nachteile des Standes der Technik, indem sie zur Verfügung stellt:

1) injizierbare Suspensionen von biologische Substanzen enthaltenden polymeren Hüllen,
2) biologische Substanzen in einer Form mit verbesserter Stabilität im Vergleich zu einfachen Emulsionen,
3) Organ-Zielspezifität (z. B. Leber, Milz, Lunge und dergleichen) aufgrund der Aufnahme der polymeren Hüllen der Erfindung durch das RES oder MNP-System,
4) ein emulgatorfreies System, wodurch Mittel vermieden werden, die möglicherweise allergische Reaktionen verursachen können, und
5) die Fähigkeit, relativ geringe Dosen von biologischen Substanzen zu injizieren und immer noch eine gute Reaktion zu erzielen, da die biologische Substanzen enthaltenden polymeren Hüllen der Erfindung auf ein bestimmtes Organ gerichtet werden können.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0025] Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung einer polymeren Hülle, hergestellt entsprechend der vorliegenden Erfindung. In der Zeichnung bezieht sich A auf die unlösliche, über Disulfidbrücken vernetzte polymere Hülle, B bezieht sich auf das Innere der polymeren Hülle, das gelösten Sauerstoff enthaltenden Fluorkohlenstoff, ein biokompatibles Öl mit darin gelöster biologischer Substanz, eine in einem wässrigen Medium gelöste biologische Substanz enthaltende Wasser-in-Öl-Emulsion, eine Suspension aus in einer Flüssigkeit

dispergierten Feststoffteilchen und dergleichen enthalten kann, C bezeichnet die Dicke der polymeren Hülle, typischerweise ungefähr 5–50 Nanometer, und D bezieht sich auf den Durchmesser der polymeren Hülle, typischerweise in einem Bereich von ungefähr 0,1 bis zu 20 μm.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0026] Entsprechend der vorliegenden Erfindung werden Zusammensetzungen zur In-vivo-Verabreichung einer biologischen Substanz durch intravenöse oder intraarterielle Injektion zur Verfügung gestellt,
wobei die biologische Substanz ausgewählt ist aus:

– einem Feststoff, dispergiert in einem nichtwässrigen biokompatiblen Dispergierungsmittel, das im Wesentlichen vollständig in einer polymeren Hülle enthalten ist,
– einer Flüssigkeit, dispergiert in einem nichtwässrigen biokompatiblen Dispergierungsmittel, das im Wesentlichen vollständig in einer polymeren Hülle enthalten ist, oder Mischungen von beiden
– wobei die größte Querschnittsabmessung der Hülle nicht größer als 10 μm ist,
– wobei die polymere Hülle ein biokompatibles Material umfasst, das im Wesentlichen durch Disulfidbindungen vernetzt ist, und
– wobei das Äußere der polymeren Hülle wahlweise durch ein geeignetes Mittel modifiziert ist, wobei das Mittel mit der polymeren Hülle durch eine optionale kovalente Bindung verbunden ist.

[0027] Die Erfindung stellt auch Zusammensetzungen zur In-vivo-Verabreichung von Paclitaxel bereit, wobei ein wasserlösliches Paclitaxel in einer biokompatiblen Flüssigkeit suspendiert ist und wobei die resultierende Suspension Paclitaxel-Partikel mit einer Querschnittsabmessung von nicht mehr als 10 μm aufweist, wobei das Paclitaxel im Wesentlichen vollständig in einer polymeren Hülle enthalten ist und wobei die polymere Hülle ein biokompatibles Material umfasst, das im Wesentlichen mittels Disulfidbindungen vernetzt ist.

[0028] Der Begriff "In-vivo-Verabreichung" bezieht sich auf die Verabreichung auf solchen Verabreichungswegen wie oral, intravenös, subkutan, intraperitoneal, intrathekal, intramuskulär, intrakraniell, durch Inhalation, topisch, transdermal, mittels Suppositorium (rektal), mittels Pessar (vaginal) und dergleichen.

[0029] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "biologische Substanz" auf pharmazeutisch wirksame Mittel, ausgewählt aus analgetischen Mitteln, Betäubungsmitteln, Antiasthmatika, Antibiotika, Antidepressiva, Antidiabetika, Antimykotika, Blutdruck senkenden Mitteln, entzündungshemmenden Mitteln, antineoplastischen Mitteln, anxiolytischen Mitteln, enzymatisch aktiven Mitteln, Nukleinsäurekonstrukten, immunstimulierenden Mitteln, immunsuppressiven Mitteln oder Vakzinen.

[0030] Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "μm" auf eine Maßeinheit von einem Tausendstel eines Millimeters.

[0031] Eine Anzahl von biokompatiblen Materialien kann in der praktischen Anwendung der vorliegenden Erfindung zur Bildung einer polymeren Hülle verwendet werden. Wie hier verwendet, beschreibt der Begriff "biokompatibel" eine Substanz, die das biologische System, in das sie eingeführt wird, nicht nennenswert verändert oder in irgendwie nachteiliger Weise beeinträchtigt. Es kann im Wesentlichen jedes Material, ob natürlich oder synthetisch, das Sulfhydrylgruppen oder Disulfidbindungen in seiner Struktur enthält, zur Herstellung einer mit Disulfid vernetzten Hülle verwendet werden. Die Sulfhydrylgruppen oder Disulfidbindungen können bereits vorher innerhalb der Struktur des biokompatiblen Materials vorhanden sein, oder sie können durch eine geeignete chemische Modifikation eingeführt werden. Zum Beispiel sind natürlich vorkommende biokompatible Materialien, wie Proteine, Polypeptide, Oligopeptide, Polynukleotide, Polysaccharide (z. B. Stärke, Cellulose, Dextrane, Alginate, Chitosan, Pektin, Hyaluronsäure und dergleichen), Lipide usw., Kandidaten für solch eine Modifikation. Andere Bindungen, wie Ester, Amide, Ether und dergleichen, können ebenfalls während des Ultraschall-Beschallungsschrittes gebildet werden (solange die notwendigen funktionellen Gruppen auf dem Ausgangsmaterial vorhanden sind).

[0032] Als Beispiele für geeignete biokompatible Materialien können natürlich vorkommende oder synthetische Proteine verwendet werden, solange solche Proteine genügend Sulfhydryl- oder Disulfidgruppen haben, so dass Vernetzung (durch Disulfidbindungsbildung zum Beispiel, als Oxidationsergebnis während Ultraschall-Beschallung) stattfinden kann. Beispiele geeigneter Proteine schließen Albumin (das 35 Cystein-Reste enthält), Insulin (das 6 Cysteine enthält), Hämoglobin (das 6 Cystein-Reste je $\alpha_2\beta_2$-Einheit enthält), Lysozym (das 8 Cystein-Reste enthält), Immunglobuline, α-2-Makroglobulin, Fibronektin, Vitronektin, Fibrinogen und dergleichen sowie Kombinationen von beliebigen zwei oder mehr davon ein.

[0033] Ein derzeit bevorzugtes Protein zur Verwendung bei der Bildung einer polymeren Hülle ist Albumin. Ein weiteres derzeit bevorzugtes Protein zur Verwendung bei der Bildung einer polymeren Hülle ist Hämoglobin. Noch ein weiteres derzeit bevorzugtes Protein zur Verwendung bei der Bildung einer polymeren Hülle ist eine Kombination von Albumin und Hämoglobin. Wahlweise könnten Proteine wie α-2-Makroglobulin, ein bekanntes Opsonin, verwendet werden, um die Aufnahme der durch die Hülle eingeschlossenen Partikel einer biologischen Substanz durch makrophagenähnliche Zellen zu verbessern oder um die Aufnahme der durch die Hülle eingeschlossenen Partikel in Leber und Milz zu verbessern. Andere funktionelle Proteine, wie Antikörper oder Enzyme, die das Richten der biologischen Substanz auf eine gewünschte Stelle erleichtern könnten, können ebenfalls bei der Bildung der polymeren Hülle verwendet werden.

[0034] Ähnlich sind synthetische Polypeptide, die Sulfhydryl- oder Disulfidgruppen enthalten, ebenfalls gute Kandidaten zur Bildung von Partikeln, die eine polymere Hülle haben. Zusätzlich sind Polyalkylenglykole (z. B. lineare oder verzweigte Kette), Polyvinylalkohol, Polyhydroxyethylmethacrylat, Polyacrylsäure, Polyethyloxazolin, Polyacrylamid, Polyvinylpyrrolidinon und dergleichen gute Kandidaten für die chemische Modifikation (um Sulfhydryl- und/oder Disulfidbindungen einzuführen) und Hüllenbildung (indem sie deren Vernetzung verursachen).

[0035] Bei der Zubereitung der Zusammensetzungen der Erfindung verwendet man ein nichtwässriges Dispergierungsmittel, um eine biologische Substanz zu suspendieren oder zu lösen. Dispergierungsmittel, die zur Verwendung in der praktischen Anwendung der vorliegenden Erfindung gedacht sind, schließen jede beliebige Flüssigkeit ein, die eine biologische Substanz suspendieren oder lösen kann, jedoch weder mit dem zur Herstellung der Hülle verwendeten Polymer noch mit der biologischen Substanz selbst chemisch reagiert. Beispiele schließen pflanzliche Öle (z. B. Sojaöl, Mineralöl, Maiskeimöl, Rapssamenöl, Kokosöl, Olivenöl, Safloröl, Baumwollsamenöl und dergleichen), aliphatische, cykloaliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe, die 4–30 Kohlenstoffatome haben (z. B. n-Dodekan, n-Dekan, n-Hexan, Cyklohexan, Toluen, Benzol und dergleichen), aliphatische oder aromatische Alkohole mit 1–30 Kohlenstoffatomen (z. B. Oktanol und dergleichen), aliphatische oder aromatische Ester mit 2–30 Kohlenstoffatomen (z. B Ethylcaprylat (Oktanoat) und dergleichen), Alkyl, Aryl oder cyklische Ether mit 2–30 Kohlenstoffatomen (z. B. Diethylether, Tetrahydrofuran und dergleichen), Alkyl- oder Arylhalide mit 1–30 Kohlenstoffatomen (und wahlweise mehr als einem Halogensubstituenten, z. B. CH_3Cl, CH_2Cl_2, CH_2Cl-CH_2Cl und dergleichen), Ketone mit 3–30 Kohlenstoffatomen (z. B. Aceton, Methylethylketon und dergleichen), Polyalkylenglykole (z. B. Polyethylenglykol und dergleichen) oder Kombinationen von beliebigen zwei oder mehr davon ein.

[0036] Besonders bevorzugte Kombinationen von Dispergierungsmitteln enthalten flüchtige Flüssigkeiten wie Dichlormethan, Ethylacetat, Benzen und dergleichen (d. h. Lösungsmittel, die einen hohen Grad an Löslichkeit für das pharmakologisch wirksame Mittel haben und die in dem anderen verwendeten Dispergierungsmittel löslich sind) zusammen mit einem weniger flüchtigen Dispergierungsmittel. Wenn sie zu dem anderen Dispergierungsmittel hinzugefügt werden, helfen diese flüchtigen Additive, die Löslichkeit des pharmakologisch wirksamen Mittels in dem Dispergierungsmittel voranzutreiben. Dies ist wünschenswert, da dieser Schritt üblicherweise zeitraubend ist. Nach der Auflösung kann die flüchtige Komponente durch Verdampfung (wahlweise unter Vakuum) entfernt werden.

[0037] Partikel von biologischen Substanzen, die im Wesentlichen vollkommen in einer polymeren Hülle enthalten oder mit ihr verbunden sind, die wie hier beschrieben zubereitet wurden, werden als Suspension in einem biokompatiblen Medium verabreicht. Dieses Medium kann ausgewählt werden aus Wasser, gepufferten wässrigen Medien, Salzlösung, gepufferter Salzlösung, wahlweise gepufferten Lösungen aus Aminosäuren, wahlweise gepufferten Lösungen aus Proteinen, wahlweise gepufferten Lösungen aus Zuckern, wahlweise gepufferten Lösungen aus Kohlenhydraten, wahlweise gepufferten Lösungen aus Vitaminen, wahlweise gepufferten Lösungen aus synthetischen Polymeren, Lipid enthaltenden Emulsionen und dergleichen.

[0038] Entsprechend einem anderen Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren für die Zubereitung einer biologischen Substanz zur In-vivo-Verabreichung durch intravenöse oder intraarterielle Injektion zur Verfügung gestellt, wobei das Verfahren umfasst, dass Medium, das biokompatibles Material, das durch Disulfidbindungen vernetzt werden kann, und eine biologische Substanz enthält, Ultraschall-Bedingungen hoher Intensität für eine Zeit ausgesetzt wird, die ausreicht, das biokompatible Material durch im Wesentlichen Disulfidbindungen zu vernetzen;

– wobei die biologische Substanz im Wesentlichen vollkommen in einer polymeren Hülle enthalten ist,
– wobei die größte Querschnittsabmessung der Hülle nicht größer als 10 μm ist, und
– wobei die biologische Substanz ein Feststoff oder eine Flüssigkeit ist, die in einem nichtwässrigen biokompatiblen Dispergierungsmittel dispergiert sind.

[0039] Somit werden entsprechend der vorliegenden Erfindung in polymeren Hüllen enthaltene biologische Substanzen synthetisiert, indem hochintensiver Ultraschall angewandt wird. Zwei nicht lineare akustische Prozesse werden in die Bildung stabiler polymerer Hüllen (d. h. akustische Emulgierung und Kavitation) einbezogen. Zunächst dispergiert die akustische Emulgierung die biologische Substanz in die wässrige Proteinlösung. Die gebildete Dispersion wird dann chemisch vernetzt und stabilisiert durch die Bildung von Disulfidbindungen. Die Disulfidbindungen werden von den Cystein-Resten (in dem Falle, wo das Polymer ein Protein wie Albumin ist) gebildet, die durch Superoxid oxidiert werden, das durch akustische Kavitation erzeugt wird.

[0040] Die sich ergebende Suspension wird wahlweise durch Centriconfilter gefiltert (100 kDa Rückhaltevermögen), und die gefilterten Konstrukte oder Mikroblasen werden erneut in normaler Salzlösung oder geeignetem Puffer suspendiert. Fig. 1 zeigt ein Schema solch eines Konstruktes. Der durchschnittliche Durchmesser dieser Konstrukte ist ungefähr 2 µm. Von der Partikelgrößenverteilung, wie mit einem Elzone-Partikelzähler festgestellt, wird gesehen, dass sie recht eng ist (eine Gauß-Verteilung mit einem mittleren Durchmesser von ungefähr 3 µm wird typischerweise beobachtet). Der Größenbereich von mittels dieser Technik erhaltenen Partikeln liegt zwischen 0,1 µm bis 20 µm. Ein bevorzugter Größenbereich ist 0,5 bis 10 µm, und der bevorzugteste Bereich ist 1 bis 5 µm. Diese Größe ist ideal geeignet für medizinische Anwendungen, da intravenöse oder intraarterielle Injektionen ohne das Risiko der Blockierung kleiner Blutgefäße und nachfolgender Gewebeschädigung (Ischämie infolge von Sauerstoffentzug) durchgeführt werden können. Zum Vergleich: normale rote Blutzellen haben einen Durchmesser von ungefähr 8 µm.

[0041] Ein nicht naheliegendes Merkmal des oben beschriebenen Prozesses liegt in der Wahl des Dispergierungsmittels, insbesondere hinsichtlich der Polarität des Dispergierungsmittels. Die Bildung einer Hülle um die Partikel der biologischen Substanz ist verbunden mit einer Neuorientierung des biokompatiblen Materials an der Grenzfläche zwischen der wässrigen und der nichtwässrigen Phase, dergestalt dass die hydrophilen Bereiche in dem biokompatiblen Material der wässrigen Phase ausgesetzt werden, während die hydrophoben Bereiche in dem biokompatiblen Material in Richtung der nichtwässrigen Phase orientiert werden. Falls das biokompatible Material ein Protein ist, muss dem Polymer zur Durchführung der Entfaltung oder Änderung der Konformation Energie zugeführt werden. Die freie Energie der Grenzfläche (Grenzflächen-Spannung) zwischen den beiden flüssigen Phasen (d. h. wässrig und nichtwässrig) trägt zu Änderungen der Proteinkonformation an dieser Grenzfläche bei. Thermische Energie trägt ebenfalls zu dem Energie-Pool bei, der zur Entfaltung und/oder Änderung der Proteinkonformation benötigt wird.

[0042] Die Zufuhr thermischer Energie ist eine Funktion solcher Variablen wie die Schallleistung, die beim Ultraschallbeschallungsvorgang hoher Intensität angewandt wird, die Zeit der Ultraschallbeschallung hoher Intensität, die Art des der Ultraschallbeschallung mit hoher Intensität ausgesetzten Materials, das Volumen des Materials, das der Ultraschallbeschallung mit hoher Intensität ausgesetzt wird und dergleichen. Die Schallleistung von Ultraschallbeschallungsvorgängen hoher Intensität kann stark variieren; typischerweise fällt sie in den Bereich von ungefähr 1 bis zu 1000 Watt/cm^2, wobei eine Schallleistung im Bereich von ungefähr 50 bis zu 200 Watt/cm^2 derzeit ein bevorzugter Bereich ist. Ähnlich kann die Zeit der Aussetzung an Ultraschallbeschallung hoher Intensität stark variieren; typischerweise fällt sie in den Bereich von wenigen Sekunden bis zu ungefähr 5 Minuten. Vorzugsweise wird die Zeit des Aussetzens an Ultraschallbeschallung hoher Intensität in den Bereich von ungefähr 15 bis zu 60 Sekunden fallen. Fachleute erkennen, dass je höher die angewandte Schallleistung ist, umso weniger Zeit des Aussetzens an Ultraschallbeschallung hoher Intensität benötigt wird, und umgekehrt.

[0043] Die freie Energie an der Grenzfläche ist direkt proportional zur Polaritätsdifferenz zwischen den zwei Flüssigkeiten. Somit ist bei einer gegebenen Arbeitstemperatur eine minimale freie Energie an der Grenzfläche zwischen den zwei Flüssigkeiten notwendig, um die gewünschte polymere Hülle zu bilden. Somit sind, falls eine homologe Serie von Dispergierungsmitteln mit gradueller Änderung der Polarität genommen wird, zum Beispiel Ethylester von Alkansäuren, höhere Homologa zunehmend apolar, d. h., die Grenzflächenspannung zwischen diesen Dispergierungsmitteln und Wasser steigt, wie die Anzahl der Kohlenstoffatome im Ester ansteigt. Somit ward gefunden, dass, obwohl Ethylacetat wasserunmischbar ist (d. h. ein Ester einer Säure mit 2 Kohlenstoffen), dieses Dispergierungsmittel allein bei Raumtemperatur (~20°C) keine signifikante Ausbeute an mit polymeren Hüllen überzogenen Partikeln ergeben wird. Im Gegensatz dazu ergibt ein höherer Ester wie Ethyloctanoat (Ester einer Säure mit 8 Kohlenstoffen) mit polymeren Hüllen beschichtete Partikel in hoher Ausbeute. Tatsächlich ergibt Ethylheptanoat (Ester einer 7-Carbonsäure) eine mäßige Ausbeute, während die niedrigeren Ester (Ester von Säuren mit 3, 4, 5 oder 6 Kohlenstoffen) eine geringe Ausbeute ergeben. Somit kann man bei einer gegebenen Temperatur einen Zustand einer Minimum-Grenzflächenspannung zwischen wässrigem und Dispergierungsmittel festlegen, die zur Bildung großer Ausbeuten von mit polymeren Hüllen überzogenen Partikeln benötigt wird.

[0044] Die Temperatur ist eine andere Variable, die manipuliert werden kann, um die Ausbeute von mit polymeren Hüllen überzogenen Partikeln zu beeinflussen. Im Allgemeinen nimmt die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit mit zunehmender Temperatur ab. Die Rate der Veränderung der Oberflächenspannung mit der Temperatur ist bei verschiedenen Flüssigkeiten oft unterschiedlich. Somit kann zum Beispiel die Grenzflächenspannung ($\Delta\gamma$) zwischen zwei Flüssigkeiten $\Delta\gamma_1$ bei Temperatur T_1 sein und $\Delta\gamma_2$ bei Temperatur T_2. Falls $\Delta\gamma_1$ bei T_1 nahe dem zur Bildung von polymeren Hüllen der vorliegenden Erfindung benötigten Minimum ist, und falls $\Delta\gamma_2$ (bei Temp. T_2) größer ist als $\Delta\gamma_1$, dann wird eine Temperaturänderung von T_1 zu T_2 die Ausbeute von polymeren Hüllen erhöhen. Dies wird tatsächlich im Falle von Ethylheptanoat beobachtet, das eine mäßige Ausbeute bei 20°C ergibt, jedoch eine hohe Ausbeute bei 10°C.

[0045] Die Temperatur beeinflusst auch den Dampfdruck der verwendeten Flüssigkeiten. Je niedriger die Temperatur, umso niedriger ist der Gesamtdampfdruck. Je niedriger der Gesamtdampfdruck, umso besser funktioniert das Zusammenbrechen der Kavitationsblase. Ein besser funktionierendes Zusammenbrechen der Ultraschallbeschallungsblase korreliert mit einer erhöhten Rate der Peroxid-(HO_2^-)-Bildung. Eine erhöhte Rate der Peroxid-Bildung führt zu erhöhten Ausbeuten an polymeren Hüllen bei niedrigeren Temperaturen. Als eine gegengleiche Betrachtung erhöht sich jedoch die Reaktionsrate für die Oxidation der Sulfhydrylgruppen (d. h. um Disulfidbindungen zu bilden) durch Peroxid-Ionen mit ansteigender Temperatur. Somit besteht für eine gegebene Flüssigkeit, die Ultraschallbeschallungs-Bedingungen ausgesetzt wird, ein ziemlich enger Bereich von optimalen Betriebstemperaturen, innerhalb derer eine hohe Ausbeute an polymeren Hüllen erzielt wird.

[0046] Somit diktiert eine Kombination von zwei Effekten, d. h. die Änderung der Oberflächenspannung mit der Temperatur (die die Entfaltung und/oder Konformationsänderungen des Polymers direkt beeinflusst) und die Änderung in der Reaktionsausbeute (wobei die Reaktion die Vernetzung des Polymers über die Bildung von Disulfidbindungen ist) mit der Temperatur, die Gesamtumsetzung oder -ausbeute von mit polymeren Hüllen überzogenen Partikeln. Geeignete Temperaturen für die Herstellung von polymeren Hüllen der Erfindung fallen in den Bereich von ungefähr 0–80°C.

[0047] Der oben beschriebene Ultraschallbeschallungsprozess kann beeinflusst werden, um mit polymeren Hüllen überzogene Partikel herzustellen, die eine biologische Substanz enthalten und einen Bereich an Größen haben. Derzeit bevorzugte Partikelradien fallen in den Bereich von ungefähr 0,1 bis zu ungefähr 5 μm. Eine enge Größenverteilung in diesem Bereich ist besonders geeignet zur intravenösen Verabreichung der biologischen Substanz. Die mit der polymeren Hülle überzogenen Partikel werden dann vorzugsweise in biokompatiblem Medium suspendiert (wie hier beschrieben), bevor sie mit geeigneten Mitteln verabreicht werden.

[0048] Zusätzlich kann die polymere Hülle wahlweise durch ein geeignetes Mittel modifiziert werden, wobei das Mittel durch eine optionale kovalente Bindung mit der polymeren Hülle verbunden ist. Für solche Verbindungen in Betracht kommende kovalente Bindungen schließen Ester, Ether, Urethan, Diester, Amid, sekundäres oder tertiäres Amin, Phosphatester, Sulfatester und ähnliche Bindungen ein. Geeignete Mittel, die für diese optionale Modifikation der polymeren Hülle ins Auge gefasst werden, schließen synthetische Polymere (Polyalkylenglykole (z. B. lineares oder verzweigtes Polyethylenglykol), Polyvinylalkohol, Polyhydroxyethylmethacrylat, Polyacrylsäure, Polyethyloxazolin, Polyacrylamid, Polyvinylpyrrolidinon und dergleichen), Phospholipide (wie Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (P1), Sphingomyelin und dergleichen), Proteine (wie Enzyme, Antikörper und dergleichen), Polysaccharide (wie Stärke, Cellulose, Dextrane, Alginate, Chitosan, Pektin, Hyaluronsäure und dergleichen), chemische Modifikationsmittel (wie Pyridoxal-5'-phosphat, Derivate von Pyridoxal, Dialdehyde, Diaspirinester und dergleichen) oder Kombinationen von beliebigen zwei oder mehr davon ein.

[0049] Variationen des Hauptthemas von gelöster biologischer Substanz, die in einer polymeren Hülle eingeschlossen ist, sind möglich. Eine Suspension von feinen Partikeln biologischer Substanz in einem biokompatiblen Dispergierungsmittel könnte verwendet werden (anstelle eines biokompatiblen Dispergierungsmittels, das die gelöste biologische Substanz enthält), um eine polymere Hülle herzustellen, die in einem Dispergierungsmittel suspendierte Partikel der biologischen Substanz enthält. Mit anderen Worten, die polymere Hülle könnte eine gesättigte Lösung einer biologischen Substanz in einem Dispergierungsmittel enthalten. Eine andere Variante ist eine polymere Hülle, die einen festen Kern einer biologischen Substanz enthält, der hergestellt wird durch anfängliches Lösen der biologischen Substanz in einem flüchtigen organischen Lösungsmittel (z. B. Benzol), Bilden der polymeren Hülle und Verdampfen des flüchtigen Lösungsmittels unter Vakuum, z. B. in einem Rotationsverdampfer, oder Gefriertrocknen der gesamten Suspension. Dies mündet in eine Struktur, die einen festen Kern der biologischen Substanz hat, die umgeben wird von einem Polymermantel. Dieses letztere Verfahren ist besonders vorteilhaft, um hohe Dosen einer biologischen Substanz in einem verhältnismäßig kleinen Volumen zuzuführen. In einigen Fällen könnte das biokompatible Material, das die Hülle um den Kern

bildet, selbst ein Therapeutikum oder Diagnosemittel sein, z. B. im Falle von Insulin, das als Teil einer polymeren Hülle verabreicht werden kann, die im oben beschriebenen Ultraschallbeschallungsvorgang gebildet wurde. In anderen Fällen könnte das die Hülle bildende Polymer an der Verabreichung einer biologischen Substanz teilhaben, z. B. im Falle von Hämoglobin, das als Teil einer polymeren Hülle zugeführt werden kann, die im oben beschriebenen Ultraschallbeschallungsvorgang gebildet wurde, wodurch ein Blutersatz zur Verfügung gestellt wird, der eine hohe Sauerstoffbindungskapazität hat.

[0050] Variationen der polymeren Hülle sind ebenfalls möglich. Zum Beispiel könnte eine kleine Menge von PEG, das Sulfhydrylgruppen enthält, in dem Polymer eingeschlossen werden. Das PEG wird, wenn es der Ultraschallbeschallung ausgesetzt wird, in dem Polymer vernetzt und bildet einen Bestandteil der polymeren Hülle. Wahlweise kann das PEG nach der Bereitung der Hülle an die polymere Hülle gekoppelt werden (anstatt als Teil in das Medium integriert zu werden, aus dem die Hülle hergestellt wird).

[0051] PEG ist bekannt für sein nichtadhäsives Wesen und wurde an Proteine und Enzyme angeheftet, um deren Zirkulationszeit in vivo zu erhöhen [Abuchowski et al., J. Biol. Chem. Bd. 252: 3578 (1977)]. PEG wurde ebenfalls an Phospholipide angeheftet, welche die Lipiddoppelschicht in Liposomen bilden, um ihre Aufnahme zu vermindern und die Lebensdauer in vivo zu verlängern [Klibanov et al., FEBS Letters Bd. 268: 235 (1990)]. Somit verändert der Einbau des PEG in die Wände von vernetzten Proteinhüllen deren Zirkulationszeit im Blut. Diese Eigenschaft kann ausgenutzt werden, um höhere Spiegel der biologischen Substanz im Blut und längere Freisetzungszeiten für die biologische Substanz zu erreichen.

[0052] Nützlich für die Modifikation der polymeren Hülle sind elektrophile PEG-Derivate, einschließlich PEG-Imidazole, Succinimidylsuccinate, Nitrophenylcarbonate, Tresylate und dergleichen; nukleophile PEG-Derivate, einschließlich PEG-Amine, Aminosäureester, Hydrazide, Thiole und dergleichen. Es wird erwartet, dass die PEG-modifizierte polymere Hülle längere Zeit im Kreislauf erhalten bleibt als ihre nicht modifizierten Gegenstücke. Die Modifikation der polymeren Hülle mit PEG kann vor der Bildung der Hülle vorgenommen werden oder nach deren Bildung. Die derzeit bevorzugte Technik ist, die polymere Hülle nach deren Bildung zu modifizieren. Andere Polymere, einschließlich Dextran, Alginate, Hydroxyethyl-Stärke und dergleichen, können bei der Modifikation der polymeren Hülle verwendet werden.

[0053] Weiterhin sind etliche Variationen möglich. Zum Beispiel kann das Dispergierungsmittel innerhalb der polymeren Hülle variiert werden, eine große Vielfalt von biologischen Substanzen kann verwendet werden, und ein weiterer Bereich an Proteinen, wie auch andere natürliche und synthetische Polymere, kann bei der Bildung der Wände der polymeren Hülle verwendet werden. Anwendungen können auch ziemlich breit variieren.

[0054] Entsprechend einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung werden polymere Hüllen, zubereitet wie oben beschrieben, für die In-vivo-Verabreichung von biologischen Substanzen verwendet. Beispiele von pharmakologisch wirksamen Mitteln, für die praktische Verwendung der vorliegenden Erfindung vorgesehen, sind u. a. analgetische Mittel (z. B. Acetominophen, Aspirin, Ibuprofen, Morphin und deren Derivate und dergleichen), Antiasthmatika (z. B. Azelastin, Ketotifen, Traxanox und dergleichen), Antibiotika (z. B. Neomycin, Streptomycin, Chloramphenicol, Cephalosporin, Ampicillin, Penicillin, Tetracyclin und dergleichen), Antidepressiva (z. B. Nefopam, Oxypertin, Imipramin, Trazadon und dergleichen), Antidiabetika (z. B. Biguanidine, Hormone, Sulfonylurea-Derivate und dergleichen), Antimykotika (z. B. Amphotericin B, Nystatin, Candicidin und dergleichen), Blutdruck senkende Mittel (z. B. Propanolol, Propafenon, Oxyprenolol, Nifedipin, Reserpin und dergleichen), steroidale entzündungshemmende Mittel (z. B. Cortison, Hydrocortison, Dexamethason, Prednisolon, Prednison, Fluazacort und dergleichen), nichtsteroidale entzündungshemmende Mittel (z. B. Indomethacin, Ibuprofen, Ramifenizon, Piroxicam und dergleichen), antineoplastische Mittel (z. B. Adriamycin, Cyclophosphamid, Actinomycin, Bleomycin, Duanorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Mitomycin, Methotrexat, Fluorouracil, Carboplatin, Carmustin (BCNU), Cisplatin, Etoposid, Interferone, Phenesterin, Paclitaxel (wie hier angewandt, soll der Begriff "Paclitaxel" Paclitaxel-Analoga und Wirkstoffpräkursoren, Taxane und andere Paclitaxel-ähnliche Arzneimittel einschließen, z. B. Taxoter und dergleichen), Camptothecin und dessen Derivate (deren Bestandteile vielversprechend in der Behandlung von Dickdarmkrebs sind), Vinblastin, Vincristin, wie auch hormonelle antineoplastische Mittel wie Östrogene, Progestogene, Tamoxifen und dergleichen), anxiolytische Mittel (z. B. Dantrolen, Diazepam und dergleichen), enzymatisch wirksame Mittel (z. B. DNase, Ribozyme und dergleichen), Nukleinsäure-Konstrukte (z. B. die codierende Sequenz von IGF-1, die codierende Sequenz von Faktor VIII, die codierende Sequenz von Faktor IX, Antisense-Nukleotidsequenzen und dergleichen), immunstimulierende Mittel (d. h. Interleukine, Interferone, Vakzine und dergleichen), immunsuppressive Mittel (z. B. Cyclosporin (CsA), Azathioprin, Mizorobin, FK506, Prednison und dergleichen), wie auch andere pharmakologisch aktive Mittel, wie Cimetidin, Mitotan, Visadin, Halonitrosoharnstoffe, Anthracycline, Ellipticin, Benzocain, Barbiturate und dergleichen.

[0055] Schlüsselunterschiede zwischen der biologische Substanzen enthaltenden polymeren Hülle der Erfindung und Protein-Mikrokugeln des Standes der Technik liegen in der Art der Bildung und dem Endzustand des Proteins nach der Bildung der polymeren Hülle und in seiner Fähigkeit, kaum wasserlösliche oder im Wesentlichen wasserunlösliche Mittel zu tragen. Entsprechend der vorliegenden Erfindung ist das Polymer (z. B. ein Protein) selektiv chemisch vernetzt durch die Bildung von Disulfidbindungen, z. B. durch die Aminosäure Cystein, die in der natürlichen Struktur einer Anzahl von Proteinen vorkommt. Ein Ultraschallbeschallungsvorgang wird angewandt, um ein Dispergierungsmittel, das eine gelöste oder suspendierte biologische Substanz enthält, in einer wässrigen Lösung eines biokompatiblen Materials, das Sulfhydryl- oder Disulfidgruppen (z. B. Albumin) trägt, zu dispergieren, wobei eine Hülle aus vernetztem Polymer um winzige Tröpfchen eines nichtwässrigen Mediums herum gebildet wird. Der Ultraschallbeschallungsvorgang ruft eine Kavitation in der Flüssigkeit hervor, die eine enorme lokale Erhitzung verursacht, und mündet in der Bildung von Peroxid-Ionen, die das Polymer durch Oxidation der Sulfhydryl-Reste vernetzen (und/oder durch Unterbrechen von bestehenden Disulfidbindungen), um neue vernetzte Disulfidbindungen zu bilden.

[0056] Im Gegensatz zum Verfahren der Erfindung ist das Verfahren der Glutaraldehyd-Vernetzung im Stand der Technik nicht spezifisch und eigentlich wirksam mit jeder beliebigen nukleophilen Gruppe, die in der Proteinstruktur vorhanden ist (z. B. Amine, Sulfhydryle und Hydroxyle). Hitze-Denaturierung, wie durch den Stand der Technik gelehrt, verändert die Proteinstruktur signifikant und irreversibel. Im Gegensatz dazu ist die Disulfid-Bildung, die mit der vorliegenden Erfindung erwogen wird, sehr spezifisch und verändert das Protein nicht wesentlich. Ferner unterscheiden sich Partikel und Tröpfchen einer biologischen Substanz, die innerhalb einer polymeren Hülle enthalten sind, von vernetzten oder durch Hitze denaturierten Protein-Mikrokugeln des Standes der Technik, weil die mit dem Verfahren der Erfindung erzeugte polymere Hülle verhältnismäßig dünn ist im Vergleich zu dem Durchmesser des überzogenen Partikels. Es wurde festgestellt (durch Transmissions-Elektronenmikroskopie), dass die "Hüllendicke" des Polymerüberzuges für ein überzogenes Partikel mit einem Durchmesser von 1 μm (1000 Nanometer) ungefähr 25 nm beträgt. Im Gegensatz dazu haben Mikrokugeln des Standes der Technik keine Proteinhüllen, sondern haben eher Protein, das durch das Volumen der Mikrokugel dispergiert ist.

[0057] Die polymere Hülle, die feste oder flüssige Kerne von biologischer Substanz enthält, erlaubt die Verabreichung hoher Dosen der biologischen Substanz in verhältnismäßig geringen Volumina. Dies minimiert die Belastung des Patienten beim Erhalten großer Mengen von Flüssigkeit und minimiert den Krankenhausaufenthalt. Zusätzlich sind die Wände der polymeren Hülle im Allgemeinen in vivo durch proteolytische Enzyme vollständig abbaubar (z. B. wenn das Polymer ein Protein ist), was in dem Fehlen von Nebenwirkungen seitens des Zufuhrsystems resultiert, wie es bei derzeitigen Formulierungen häufig der Fall ist.

[0058] Entsprechend diesem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung sind Tröpfchen oder Partikel einer biologischen Substanz innerhalb einer Hülle mit einem Querschnittsdurchmesser von nicht mehr als ungefähr 10 μm enthalten. Ein Querschnittsdurchmesser von weniger als 5 μm ist bevorzugter, während ein Querschnittsdurchmesser von ungefähr 2 μm derzeit der bevorzugteste für den intravenösen Applikationsweg ist.

[0059] Entsprechend einem anderen Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wurde entdeckt, dass polymere Hüllen, wie hier beschrieben, wenn sie aus Hämoglobin hergestellt sind, eine überraschend hohe Sauerstoffbindungsfähigkeit haben und daher als Blutersatz nützlich sind. Hämoglobin (Lehninger, in Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York, S. 145–149, 1975) ist ein Protein mit einem MW von 64.500, das aus einem Tetramer besteht (zwei α- und zwei β-Ketten). Jede α- und β-Kette bindet einen Häm-Rest in einer nicht kovalenten Bindung. Die α- und β-Ketten werden auch von nichtkovalenten Bindungen zusammengehalten, die aus Wasserstoff-Bindungen und van-der-Waals-Kräften resultieren. Die vier Häm-Gruppen, eine in jeder Untereinheit, sind fähig, vier Sauerstoff-Moleküle zu binden. Diese flachen Häm-Gruppen enthalten ein Eisenatom, das sich in einer rechtwinklig planaren Koordination befindet. Die vier Häme sind im intakten Molekül verhältnismäßig weit voneinander entfernt.

[0060] Die Wechselwirkung oder Kooperation von Häm-Einheiten beim Binden von Sauerstoff erhöht die Sauerstoffbindungskapazität jeder Häm-Einheit innerhalb des tetrameren Hämoglobin-Moleküls erheblich. Im Allgemeinen würde erwartet werden, dass eine einzelne isolierte Häm-Einheit nur ein einziges Sauerstoff-Molekül bindet. Jedoch kooperieren benachbarte Häm-Einheiten innerhalb des Hämoglobin-Moleküls, um den gebundenen Sauerstoff je Häm-Einheit zu erhöhen. Diese Kooperationsfähigkeit wird in Form eines "Hill-Koeffizienten" beschrieben, dessen Wert die Anzahl interagierender Sauerstoffbindungsstellen widerspiegelt. Im Falle von natürlichem Hämoglobin beträgt der Hill-Koeffizient ungefähr 2,8.

[0061] Lösliches Hämoglobin macht ungefähr 90% des gesamten Proteins in roten Blutzellen aus. 100 ml Vollblut sind aufgrund der Bindungsfähigkeit von Hämoglobin fähig, annähernd 21 ml gasförmigen Sauerstoff zu absorbieren. Ähnlich wichtig für die Bindung von Sauerstoff ist die Tatsache, dass Hämoglobin bei der Freigabe des gebundenen Sauerstoffs an Gewebe ebenso wirkungsvoll ist. Die Fähigkeit von Hämoglobin, Sauerstoff zu binden und abzugeben, wird oft quantitativ als P_{50} (oder $P_{1/2}$) ausgedrückt. Zum Beispiel ist der P_{50}-Wert für Vollblut, d. h. der Partialdruck des Sauerstoffs, der in einer Hämoglobinsättigung von fünfzig Prozent mündet, ungefähr 28 mm Hg.

[0062] Das Verhältnis zwischen Sauerstoffpartialdruck und prozentualer Sättigung von Hämoglobin kann als eine S-Kurve dargestellt werden, deren Lage durch den pH-Wert beeinflusst wird (der Bohr-Effekt). Je höher der pH-Wert der Hämoglobin-Lösung bei einem gegebenen Sauerstoffpartialdruck ist, umso höher ist die prozentuale Sättigung mit Sauerstoff und umso niedriger der P_{50}; die Sauerstoff-Sättigungskurve wird zur linken Seite auf der Abszisse verschoben. Umgekehrt, je niedriger der pH-Wert der Hämoglobin-Lösung ist, umso niedriger ist die prozentuale Sättigung mit Sauerstoff und umso höher ist der P_{50}; die Sauerstoff-Sättigungskurve wird zur rechten Seite auf der Abszisse verschoben. Wenn sich Hämoglobin vom verhältnismäßig alkalischen pH-Wert der Lungen zum relativ sauren pH-Wert sauerstoffarmer Gewebe bewegt (wobei durch anaerobe Atmung Milchsäure erzeugt wird), werden die Hämoglobin-Moleküle demzufolge eine Neigung haben, ihre Sauerstoff-Ladung abzugeben. Somit ändert sich im Allgemeinen die Affinität des Hämoglobins zu Sauerstoff in der entgegensetzten Richtung wie der P_{50} des Hämoglobins.

[0063] Modifikationen des Hämoglobin-Moleküls oder seiner Konformation können mit Änderungen der Sauerstoffbindungsaffinität verbunden sein. Zum Beispiel lockert die Assoziation mit 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG, wie es innerhalb des RBC vorkommt) die Assoziation zwischen Sauerstoff und Hämoglobin, was die Abgabe von Sauerstoff an Gewebe erleichtert; Serumspiegel von 2,3-DPG steigen unter physiologischen Bedingungen, in denen eine erhöhte Zufuhr von Sauerstoff wünschenswert ist, zum Beispiel in großen Höhen und während der Schwangerschaft. Die Oxidation des Eisen-Ions in der prosthetischen Gruppe des Häm von Fe(II) zu Fe(III) resultiert in der Bildung von Methämoglobin (met-Hb), das Wasser so fest bindet, dass es die Sauerstoffübertragung ausschließt. Diese Oxidation oder 'Autooxidation' ist ein fortwährender Vorgang in vivo, welcher mittels eines Systems aus Redoxenzymen innerhalb der roten Blutzelle in Schach gehalten wird.

[0064] Hämoglobin, das Protein für Sauerstoff-Transport und -Zufuhr, kann von den Membranen der Wand roter Blutzellen oder dem Stroms (das Stroms enthält die spezifischen Antigene, die die Blutgruppe festlegen) sowie von anderen Zell- und Plasmakomponenten getrennt werden. Falls eine solche Trennung und Isolation durchgeführt wird, enthält das resultierende stromafreie Hämoglobin keine Antigen-Materialien; somit sind Blutgruppenbestimmung und -anpassung nicht mehr notwendig.

[0065] Von stromafreiem Hämoglobin (SFH), das aus der Mikroumgebung der roten Blutzellen gewonnen wurde, wurde gefunden, dass es eine Neigung hat, Sauerstoff zu fest (ein niedriger P_{50}) zu binden und auch, dass es eine kurze Zirkulationshalbwertszeit nach der Transfusion hat. Der niedrige P_{50}, der die Linksverschiebung in der Hämoglobin-Sauerstoff-Bindungskurve widerspiegelt, war teilweise eine Folge des Aussetzens von stromafreiem Hämoglobin an einen höheren pH-Wert im Plasma (7,4) als jener, der im Erythrozyt erfahrungsgemäß vorhanden ist (7,2); ferner wurde die natürliche Assoziation zwischen Hämoglobin und 2,3-Diphosphoglycerat zerstört, als Hämoglobin aus der roten Zelle entfernt wurde, was eine weitere Reduzierung des P_{50} zur Folge hatte. Hinsichtlich der Clearance aus der Zirkulation wird beobachtet, dass stromafreies Hämoglobin durch die Nieren schnell ausgeschieden wird, mit einer Tranfusionshalbwertszeit von ($t_{1/2}$) von lediglich ungefähr 100 Minuten. Der Hill-Koeffizient für SFH liegt im Bereich von 2,3–2,8.

[0066] Chemisch veränderte Hämoglobine, die einige der Mängel von stromafreiem Hämoglobin angehen, wurden erforscht. Im Stand der Technik beschriebene Modifikationen umfassen verschiedene Mittel zur intramolekularen Vernetzung von stromafreiem Hämoglobin; Mittel zur intermolekularen Vernetzung von stromafreiem Hämoglobin mit Mitteln niedrigen Molekulargewichts; Mittel zur intra- und intermolekularen Vernetzung von stromafreiem Hämoglobin mit Mitteln niedrigen Molekulargewichts; und Mittel zur Kopplung stromafreien Hämoglobins an andere Polymere.

[0067] Verfahren zur intramolekularen Vernetzung von stromafreiem Hämoglobin sind im Stand der Technik bekannt; siehe zum Beispiel US-Patente 4,584,130, 4,598,064 und 4,600,531. Diese Behandlung modifiziert stromafreies Hämoglobin durch kovalentes Verbinden der Lysin-99-Reste auf den Alpha-Ketten des Proteins über eine Fumarat-Brücke. Als eine Folge dieser intramolekularen Vernetzung hat mit Diaspirin vernetztes Hämoglobin eine Sauerstoff-Affinität, die mit jener von Blut äquivalent ist. Ferner kann mit Diaspirin vernetztes Hämoglobin (Molekulargewicht 64.500) nicht mehr in Dimere zerfallen (Molekulargewicht 32.250). Infolgedes-

sen beträgt die Retentionszeit von mit Diaspirin alpha-alpha-vernetztem Hämoglobin vier bis acht Stunden (was das Zwei- bis Vierfache der von stromafreiem Hämoglobin ist). Jedoch ist dies keine ausreichend lange Zeit zur Nutzung bei der Behandlung akuter Hämorrhagie, da ein Sauerstoffträger benötigt wird, der Sauerstoff einige Tage lang tragen kann, wenn der Patient eine beträchtliche Menge Blut verloren hat. Der P_{50} von mit Diaspirin vernetztem Hämoglobin befindet sich im physiologischen Bereich (24–28 mm Hg), ebenso wie der Hill-Koeffizient (2,5–2,8).

[0068] Unter Verwendung von Vernetzungsmitteln mit niedrigen Molekulargewichten wurden Hämoglobin-Moleküle auch intermolekular miteinander vernetzt. Zum Beispiel ist im US-Patent Nr. 4,336,248 die Kopplung von Hämoglobin-Molekülen aneinander und/oder an Serum-Proteine und Gelatine-Derivate unter Verwendung von Dialdehyden, am besten gefolgt von der Zugabe von Pyridoxalphosphat, beschrieben. Die Vernetzung mit einem bifunktionalen oder polyfunktionalen Vernetzungsmittel mit niedrigem Molekulargewicht wurde in den US-Patenten 4,001,401, 4,001,200, 4,053,590 und 4,061,736 beschrieben. Die Produkte der intermolekularen Hämoglobin-Vernetzung sind oft nicht einzeln lösliche Tetramere, sondern vielfache Tetramere aus kovalent verbundenem Hämoglobin, um lösliche Oligomere zu bilden. Typischerweise haben Produkte solcher intermolekularen Vernetzung sauerstofftragende und -zuführende Eigenschaften, die nicht mit Blut äquivalent sind (ein P_{50} von 18–23 für mit Glutaraldehyd polymerisiertem Hämoglobin, im Vergleich zu einem P_{50} von 28 für Vollblut und Hill-Koeffizienten im Bereich von 1,8–2,8). Ferner sind Produkte aus intermolekularer Vernetzung durch Glutaraldehyd im Stand der Technik bekannt dafür, dass sie antigen sind [siehe D. H. Marks et al., in Military Med. 152: 473 (1987)].

[0069] Im Allgemeinen vermindert die intramolekulare und intermolekulare Vernetzung von Hämoglobin einige der Nierengifitigkeitsprobleme, die sich aus der Dissoziation unmodifizierten Hämoglobins in αβ-Dimere ergeben. Jedoch wird der kolloidale osmotische Druck (COP), der von löslichem Hämoglobin ausgeübt wird, durch intramolekulare Vernetzung nicht signifikant vermindert. Dies begrenzt daher den Dosierungsspiegel von für die Applikation geeignetem löslichem Hämoglobin-Blutersatz. Im Allgemeinen bewirkt ein Anstieg des COP eine Abnahme des hydrostatischen Drucks und eine begleitende Abnahme der glomerulären Filtrationsrate, was zu Oligurie und, in schwerwiegenden Fällen, zu Anurie führt. Die im Stand der Technik beschriebene Applikation von löslichen Hämoglobinen mündete in Bradykardie, einem Ansteigen des Blutdrucks und einem Abfallen der Kreatininclearance. Vasokonstriktion und Tubulusverstopfung wurden als Grund für die renale Wirkung vermutet, die alle mit der Verwendung von löslichen Hämoglobinen als Blutersatz im Zusammenhang stehen. Eine hoch polymerisierte Form von Hämoglobin, wie sie gemäß der Beschreibung hier hergestellt werden kann, kann diese Probleme mildern, wenn sie als Blutersatz verwendet wird.

[0070] Hoch fluorierte Verbindungen, und insbesondere Perfluorkohlenstoff-Verbindungen, wurden ebenfalls aufgrund ihrer hohen Löslichkeiten für Sauerstoff als Ersatz für rote Blutzellen in Erwägung gezogen. Unter den hoch fluorierten Verbindungen, die für solche Anwendungen nützlich sind, befinden sich die Perfluorkohlenstoffe, z. B. Perfluordecalin, Perfluorindan, Perfluormethyladamantan, Perfluortripropylamin, Perfluortributylamin, Perfluoroctylbromid und dergleichen. Zur intravenösen Verwendung müssen diese Fluorkohlenstoffe, da sie wasserunvermischbar sind, als injizierbare Emulsionen dispergiert werden. Typischerweise in diesen Anwendungen verwendete Emulgatoren sind Eigelb-Lecithin und Ei-Phosphatide, welche beide das Potential haben, allergische Reaktionen herbeizuführen; siehe zum Beispiel PCT 92/06517, die eine Emulsion beschreibt, die eine Fluorchemikalie und Phospholipide wie Lysophosphatidylcholin und Lyophosphatidylethanolamin als oberflächenaktive Substanzen enthält, oder PCT 93/11868, die eine Emulsion mit Eigelb-Lecithin als Emulgator beschreibt, der hoch fluorierte, mit Chlor substituierte, azyklische organische Verbindungen als Sauerstoffträger enthält.

[0071] Fluosol-DA (Alpha-Therapeutika), eine Emulsion aus Perfluordecalin und Perfluortripropylamin, ist das einzige von der US-Bundesbehörde FDA zugelassene Produkt zur Verwendung bei der Prävention von vorübergehender Ischämie bei der Ballon-Koronar-Angioplastie. Ein weiteres Fluorkohlenstoff-Produkt, Oxygent (Alliance Pharmaceuticals) oder Perfluoroctylbromid, hat die Zulassung als ein orales Bildgebungsmittel. Zur Übersicht über Perfluorverbindungen als Blutersatzstoffe, siehe Riess et al. in Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17: 621–634 (1978).

[0072] Im Gegensatz dazu sind aus Hämoglobin hergestellte polymere Hüllen, wie hier beschrieben, "riesige" makroskopische Moleküle (aufgrund extensiver Polymerisation oder Vernetzung einer großen Anzahl von Hämoglobin-Tetramer-Molekülen), die aufgrund ihrer großen Größe in wässrigem Medium unlöslich sind. Die Polymerisation geschieht als Ergebnis der Vernetzung der Sulfhydrylgruppen an den Cysteinresten des Proteins während des Ultraschallbeschallungsvorganges. Eine polymere Hülle, die entsprechend der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde, umfasst typischerweise mindestens 10^4 vernetzte Polymer-Moleküle und kann so

viele wie 10^{12} Hämoglobintetramere haben, die in einem einzigen makroskopischen Hämoglobin-"Megamer" vernetzt sind. Es wurde unerwarteterweise herausgefunden, dass Sauerstoff reversibel an diese unlöslichen Konstrukte binden kann, mit Affinitäten, die sich in einem nützlichen Bereich für einen Ersatz von roten Blutzellen (RBC) befinden, d. h. ein P_{50} zwischen ungefähr 10 mm Hg bis ungefähr 50 mm Hg.

[0073] Aufgrund ihrer vernetzten Eigenschaft und Größe ist es wahrscheinlich, dass die unlöslichen Hämoglobin-Konstrukte der vorliegenden Erfindung eine In-vivo-Zirkulationszeit haben, die beträchtlich länger ist als Ersatzstoffe für rote Blutzellen (RBC) des Standes der Technik. Ferner ist es nicht wahrscheinlich, dass sie wegen ihrer großen molekularen (makroskopischen) Größe die Nierengiftigkeitsprobleme hervorrufen, die mit den konventionellen tetrameren oder oligomeren löslichen Formen von Hämoglobin üblich sind, die im Stand der Technik beschrieben sind.

[0074] Die verborgene "zelluläre" Natur der unlöslichen Hämoglobin-Konstrukte der vorliegenden Erfindung macht sie geeignet, Sauerstoff auf eine physiologische Weise zu transportieren, nicht unähnlich roten Blutzellen in vivo. Wegen der "megameren" Natur der unlöslichen Hämoglobin-Konstrukte dieser Erfindung werden sie einen kolloidosmotischen Druck oder onkotischen Druck haben, der vernachlässigbar ist, verglichen mit einer äquivalenten Menge (hinsichtlich der Sauerstoff-Transport-Kapazität) an löslichem Hämoglobin jedes Standes der Technik. Dies würde die intravenöse Infusion hoher Konzentrationen von Hämoglobin-Konstrukten der Erfindung erlauben, während lösliches Hämoglobin des Standes der Technik mit einer maximalen Konzentration von lediglich 6–8 g/dl infundiert werden darf, wegen der Sorge um schwerwiegenden Wasserverlust aus Geweben, die den vaskulären Raum umgeben, aufgrund der osmotischen Gradienten.

[0075] Die Zusammensetzung der Erfindung hat einen entscheidenden Vorteil gegenüber verkapselten Hämoglobin-Zusammensetzungen des Standes der Technik. Liposomale Hämoglobin-Formulierungen des Standes der Technik umfassen lösliches Hämoglobin innerhalb einer äußeren Lipidschicht. In Liposomen verkapselte Hämoglobin-Zusammensetzungen des Standes der Technik leiden unter etlichen Nachteilen, die durch die vorliegende Erfindung beseitigt werden. Die Leckage löslichen Hämoglobins aus liposomalen Zusammensetzungen kann möglicherweise Nephrotoxizität verursachen. Die unlöslichen Konstrukte der vorliegenden Erfindung werden aufgrund ihrer extensiv vernetzten Natur kein lösliches Hämoglobin verlieren. Die Aggregation von Liposomen ist bekannt dafür, dass sie das Komplementprotein C3a aktiviert. Diese Aggregation ist unwahrscheinlich im Falle von unlöslichen Konstrukten wegen ihrer Größe, die erheblich größer ist als der liposomale Größenbereich.

[0076] Die Zusammensetzung von unlöslichem vernetztem Hämoglobin gemäß der Erfindung verhindert mit löslichen Hämoglobin-Zusammensetzungen des Standes der Technik verbundene Toxizität. Die Nephrotoxizität oder Nierengiftigkeit von Hämoglobin hängt hauptsächlich mit der Clearance von löslichem dimerem, tetramerem oder oligomerem Hämoglobin aus dem Kreislauf zusammen. Das Hämoglobin der vorliegenden Erfindung, das extensiv vernetzt oder 'megamer' ist, kann nicht von der Niere ausgeschieden werden, und es ist unwahrscheinlich, das es nephrotoxisch ist. Die unlöslichen Konstrukte der vorliegenden Erfindung können nicht von den Nieren ausgeschieden werden und umgehen daher dieses Problem. Ein weiterer Vorteil der extensiv vernetzten Hämoglobin-Konstrukte der vorliegenden Erfindung gegenüber dem Stand der Technik ist das erhöhte intravaskuläre Fortbestehen aufgrund der unlöslichen Form.

[0077] Die Morphologie des unlöslichen Hämoglobin-Konstruktes (IHC) wurde unter Verwendung von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestimmt. Um die mikroskopische TEM-Aufnahme eines Querschnitts eines Rinder-IHC zu erhalten, wurde das IHC mit Glutaraldehyd fixiert, mit Osmiumtetroxid und Kalium-Eisencyanat gefärbt (um Kontrast in Bereichen mit hoher Protein-Konzentration bereitzustellen), in ein Harz mit niedriger Viskosität eingebettet und Ultramikrotomschnitte hergestellt (Schnittdicke ~75 nm). Da eine gewisse Schrumpfung im Gesamtdurchmesser und ein gewisses Verwinden der Form des IHC während dieses Vorgehens erwartet wurden, wird der wahre Durchmesser des IHC am besten durch die Partikelgrößenverteilung (3 µm; Standardabweichung 1) der Lösung dargestellt, eher als durch direkte Messungen an der mikroskopischen TEM-Aufnahme. Ein näherer Blick auf die mikroskopische TEM-Aufnahme zeigt drei unterscheidbare Regionen: eine helle Zentralregion; eine dunkle, dünne Schicht um das Partikel; und eine lose angefügte, diffuse, fleckig-graue Region, verbunden mit der äußeren Oberfläche des Partikels. Die dunkle, dünne Schicht ist die IHC-Hülle. Sie enthält eine hohe Proteindichte und entwickelt während des Färbungsverfahrens den stärksten Kontrast. Das lose angefügte, graue Material scheint natürliches Protein zu sein, das während des Fixierungsschrittes bei der Probenpräparation an der IHC-Hülle haftet. Anfängliche Messungen von dieser und vielen anderen mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Hüllendicke des Rinder-Hämoglobin-IHC ungefähr 25–35 nm ist. Hämoglobin ist ein grobkugelförmiges Protein (L. Stryer, Biochemistry, W. H. Freeman, New York, 1988) mit einem Durchmesser von 5,5 nm. Folglich ist die Proteinhülle des IHC annähernd 4 bis 20 Hä-

moglobin-Moleküle (Tetramere) dick. Somit würde eine Blase mit einem Durchmesser von 3,0 µm ungefähr 10^4 bis 10^{12} Hämoglobin-Moleküle enthalten.

[0078] Die Untersuchung von unlöslichen Hämoglobin-Konstrukten (IHC) der vorliegenden Erfindung (Mikroblasen oder Mikrokugeln) durch Zirkulardichroismus zeigte, dass der Gehalt an Alpha-Helices und Beta-Faltblättern in dem IHC sich nicht signifikant von dem des gereinigten stromafreien Hämoglobins (SFH) unterschied. Diese Beobachtung ist von Bedeutung, da sie zeigt, dass das Vernetzungsverfahren und die Bildung von unlöslichem Hämoglobin keine Denaturierung (d. h. die Veränderung der Tertiär- und Quartärstruktur) des Proteins verursacht. Diese Beobachtung wird selbstverständlich durch funktionelle Daten erhärtet, die die Beibehaltung der reversiblen Sauerstoffbindung und das Zusammenwirken zwischen sauerstoffbindenden Hämeeinheiten nach dem synthetischen Schritt zeigen.

[0079] Ein Rinder- und ein menschliches Hämoglobin-IHC wurden synthetisiert, wie im Beispiel 14 beschrieben. Wie von Fachkundigen anerkannt wird, kann das verwendete Hämoglobin aus jeder Wirbeltier-, Wirbellosen- oder eukaryotischen Quelle gewonnen werden oder kann das Produkt genetischer Manipulation von Wirbeltier- Wirbellosen- oder eukaryotischen Zellen sein. Tabelle 1 gibt eine Zusammenfassung der derzeitigen Ergebnisse.

Tabelle 1

Zusammenfassung von n_{max}- und P_{50}-Werten von beschallten Hb-Mikroblasen und unbeschalltem BHb bei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen

Effektorkonzentr. (mM)	Beschallte Hb-Mikroblasen				Unbeschallte Hb-Lösung			
	IHP		2,3-BPG		IHP		2,3-BPG	
	n_{max}	$P_{1/2}$	n_{max}	$P_{1/2}$	n_{max}	$P_{1/2}$	n_{max}	$P_{1/2}$
0	9,5	21,2	9,5	21,2	2,7	22,3	2,7	22,3
0,25	12,1	22,2	11,5	22,0	2,7	24,7	2,7	22,5
0,5	15,2	28,3	13,0	25,1	2,8	28,2	2,8	23,2
1,0	15,1	32,1	13,4	28,7	2,8	30,2	2,8	24,9
1,7	17,6	39,5	14,0	32,6	2,8	34,1	2,8	28,0

Anmerkung: Die Hill-Koeffizienten (n) für BHb-Mikroblasen sind berechnet aus der Formel:

$$n = \frac{\Delta \log (Y/1-Y)}{\Delta \log P_{O_2}}$$

wobei Y die mit Sauerstoff angereicherte Fraktion ist und P_{O_2} der Sauerstoffdruck ist. Für die Mikroblasen ist jeder Δlog(Y/1 – Y)-Term über fünf aufeinanderfolgende Punkte gemittelt.

[0080] Alle Bindungsversuche wurden bei 25°C in Tris-Puffer (pH 7,4) durchgeführt. Die IHC behalten ihre Fähigkeit bei, Sauerstoff reversibel zu binden, wie durch UV-Sichtbar-Spektren des IHC dargestellt, was das Vorhandensein von Met-Fe(III)-, Oxy-Fe(II)- und Desoxy-Fe(II)-Formen anzeigt. Das IHC kann ohne nennenswerten Abbau in mehr als zehn Zyklen zwischen den Desoxy- und Oxy-Zuständen im Kreislauf geführt werden. Dies ist wichtig, weil es zeigt, dass die Umgebung, die die aktive Häm-Stelle umgibt, während des Vorgangs der Herstellung des IHC-rote-Blutzellen-Ersatzes nicht nennenswert verändert wurde.

[0081] Diese Sauerstoffbindungsdaten lassen den Schluss zu, dass das IHC im Wesentlichen nicht denaturiertes Hämoglobin umfasst. Falls es denaturiert worden wäre, würde keine physiologische (oder eine geringere) Reaktivität beobachtet werden.

[0082] Von allosterischen Effektoren von natürlichem Hämoglobin wie Inositolhexaphosphat (IHP) und 2,3-Biphosphoglycerat (2,3-BPG) wurde gezeigt, dass sie sowohl den P_{50} erhöhten (d. h. niedrigere Sauerstoffaffinität) als auch die Kooperativität verbesserten. Dieselben Auswirkungen sind im IHC zu sehen. Obwohl die P_{50}-Werte um denselben Betrag erhöht sind, zeigt sich ein dramatischerer Effekt in der Kooperativität des IHC. Der n_{max} stieg dramatisch über den von natürlichem Hämoglobin bei Vorhandensein von 1,7 mM IHP (17,6 vs. 2,8) und 2,3-BPG (14 vs. 2,8) (siehe Tabelle 1).

[0083] Diese unerwartet hohe Zunahme der Kooperativität ist offensichtlich auf die kovalente Bindung zwischen Hämoglobin-Tetrameren innerhalb der IHC-Hülle zurückzuführen. Der Hill-Koeffizient kann nicht höher sein als die Anzahl von wechselseitig wirkenden Bindungsstellen. Die Werte von ungefähr 2,8 in natürlichem Hämoglobin spiegeln die Kooperativität in einem Tetramer wider. Jedoch findet in der IHC-Hülle eine Kommunikation zwischen etlichen der vernetzten Tetramere (aus der Bildung von Disulfidbindungen) nach der Bindung des Sauerstoffs statt. Die Wechselwirkungen mit den nächsten Nachbar-Tetrameren scheinen die stärksten zu sein; jedoch können zusätzliche schwächere Wechselwirkungen zwischen weiter entfernten Tetrameren bestehen. Im Wesentlichen ist der hohe n_{max} ein Anzeichen dafür, dass multiple Tetramere nach dem Binden von Sauerstoff innerhalb der IHC-Hülle beim Übergang vom Desoxy-T- zum Oxy-R-Zustand zusammenarbeiten. Wiederum offenbaren mikroskopische TEM-Aufnahmen von Hämoglobin-IHC eine Hüllendicke von ungefähr sechs Hämoglobin-Tetrameren. Eine Blase mit einem Durchmesser von 3,0 μm würde ungefähr 10^4 bis 10^{12} Hämoglobin-Moleküle enthalten.

[0084] Die Stabilität nach der Lagerung des IHC wurde durch Partikelzählungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zubereitung gezählt. Die IHC wurden in steriler Salzlösung bei 4°C für bis zu 6 Monate gelagert. Nach 3 Monaten hatte die Konzentration des IHC um ungefähr 10% abgenommen, während die Konzentration nach 6 Monaten um ungefähr 25–30% gefallen war.

[0085] Die Auto-Oxidationsrate des IHC (von Oxy-Fe(II) zu Met-Fe(III)) wurde als höher denn 60 Stunden, 96 Stunden und 25 Tage bei 37°C, 25°C bzw. 4°C bestimmt. Keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen wurden getroffen, um eine Inertatmosphäre aufrechtzuerhalten, als diese Ergebnisse gewonnen wurden. Der Stand der Technik zeigt klar den Nutzen, eine Inertatmosphäre wie Stickstoff aufrechtzuerhalten, um die Auto-Oxidationsrate von Hämoglobin zu reduzieren. Eine Lagerung unter solchen Bedingungen ließe erwarten, dass der Anteil von über einen längeren Zeitraum beibehaltenem Fe(II)-Hämoglobin stark ansteigen würde.

[0086] Zusätzlich kann die Auto-Oxidation durch Lagerung der IHC-Suspension mit dem oben beschriebenen Reduktionssystem von Hyashi et al. verhindert werden.

[0087] Die Pasteurisierung wurde untersucht als ein Verfahren der Sterilisation der IHC-Suspensionen im Endstadium. Zahlreiche unterschiedliche Pasteurisierungsbedingungen wurden angewandt. Partikelzählungen wurden nach jeder Bedingung angewandt, um jegliche schädlichen Auswirkungen der Temperatur auf das IHC festzustellen.

Bedingung 1:	Die Temperatur der IHC-Suspension wurde in 8 Minuten von 25–62,8°C aufgestockt und 30 Minuten lang bei dieser Temperatur gehalten. Partikelzählungen zeigten einen Abbau von weniger als 20%.
Bedingung 2:	Die Temperatur der IHC-Suspension wurde in 10 Minuten von 25–71,7°C aufgestockt und 15 Sekunden lang bei dieser Temperatur gehalten. Partikelzählungen zeigten einen Abbau von weniger als 20%.
Bedingung 3:	Die Temperatur der IHC-Suspension wurde in 12 Minuten von 25–89,5°C aufgestockt und 2 Sekunden lang bei dieser Temperatur gehalten. Partikelzählungen zeigten einen schwerwiegenden Abbau von mehr als 70%.

[0088] Somit wurden die Bedingungen 1 und 2 als für Pasteurisierungsmethoden geeignet befunden. Gamma-Strahlung als eine Sterilisationsmodalität im letzten Stadium ist ebenfalls geeignet.

[0089] Die Sauerstoff-Affinität (oder P_{50}) des IHC kann durch chemische Modifizierung des Hämoglobins mit bekannten allosterischen Effektoren verändert werden. Im Allgemeinen begrenzt die Modifizierung des Hämoglobins den Übergang zwischen den zwei Oxy- und Desoxy-Konformationen; somit wird die Oxidationsfunktion fast immer auf irgendeine Weise verändert. Falls Hämoglobin zum Beispiel in der Oxy-Form modifiziert wird, wird üblicherweise eine hohe Sauerstoff-Affinität bevorzugt, während das Umgekehrte der Fall ist, wenn die Modifizierung im Desoxy-Zustand durchgeführt wird. Derivate von Pyridoxal sind nützliche Modifikatoren, da dieses Molekül den natürlichen allosterischen Effektor 2,3-Diphosphoglycerat (DPG) nachahmt. Sie binden an die endständigen Aminoguppen des Hämoglobins. Zum Beispiel kann das Hämoglobin mit Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) zur Reaktion gebracht werden, das die natürliche Interaktion von 2,3-DPG nachahmt, um den P_{50} zu erhöhen. Andere Pyridoxal-Derivate wie 2-Nor-2-formyl-PLP, ein bifunktionales Mittel, das die Hämoglobin-β-Ketten koppelt, oder Bispyridoxaltetraphosphat sind nützliche Modifikatoren. Andere Vernetzer, wie Acyl-tris(natriummethylphosphate), können ebenfalls verwendet werden, um die β-Ketten zu vernetzen.

[0090] Aldehyd-Modifikatoren können ebenfalls verwendet werden. Zum Beispiel ist Glutaraldehyd nützlich

bei der Polymerisation von Hämoglobin und kann in Verbindung mit PLP verwendet werden.

[0091] Diaspirinester wie 3,5-Bis(dibromsalicyl)fumarat und das entsprechende Monoaspirin sind nützliche allosterische Modifikatoren. Das Aspirin bindet zwischen den α-Ketten des Hämoglobins und dem monofunktionellen Reagens an ein inneres Lysin. Beide erhöhen den P_{50} von Hämoglobin.

[0092] Somit können Konstrukte mit 'niedriger Affinität' oder 'hoher Affinität' hergestellt werden zur Applizierung in anderen Situationen als bei Traumata und akutem Blutverlust, wie in Situationen, in denen lokale Zufuhr von Sauerstoff notwendig und wohltuend ist.

[0093] Ein Konstrukt mit 'niedriger Affinität', d. h. eines mit einem hohen P_{50} (≥ 28 mm Hg), das mittels des obigen Verfahrens hergestellt wurde, bringt Nutzen bei der Verwendung von Sauerstoff als ein Adjuvans bei der Behandlung von Tumoren durch Strahlung oder Chemotherapie. Solche Konstrukte werden außerhalb des Körpers bis zur maximalen Sauerstoffkapazität beladen und dann in den Kreislauf des Tumors verabreicht. Dies erlaubt, dass eine große Menge Sauerstoff an den Tumor abgegeben wird. Aktivierter Sauerstoff, der unter Strahlung oder Chemotherapie hergestellt wird, resultiert in einer höheren zytotoxischen Aktivität im Tumorbereich.

[0094] Ein Konstrukt mit 'hoher Affinität' (P_{50} < 28 mm Hg) hat Nutzen bei der 'ischämischen Sauerstoffzufuhr'. Ischämie oder Sauerstoffmangel von Gewebe kann in einer Anzahl von pathologischen Bedingungen vorkommen, z. B. Schlaganfall, Myokardinfarkt und dergleichen. Die bevorzugte Freisetzung von Sauerstoff in solchen Bereichen würde helfen, dauerhafte Gewebeschäden zu minimieren. Ein Sauerstoffträger oder RBC-Ersatz mit einer Sauerstoff-Affinität ähnlich der von Vollblut wird Sauerstoff nicht bevorzugt in einem solchen Bereich freisetzen. Jedoch wird einer mit einer hohen Sauerstoff-Affinität (d. h. ein niedriger P_{50}, verglichen mit Vollblut) seinen Sauerstoff bevorzugt an einer solchen ischämischen Stelle freisetzen, aufgrund des hohen Sauerstoff-Gradienten zwischen dem Blut und dem Gewebe, während er den größten Teil seines Sauerstoffs unter Bedingungen von normal anzutreffenden Sauerstoff-Gradienten zurückhält. Die Affinitäten von unlöslichen Hämoglobin-Konstrukten der vorliegenden Erfindung können für solche Anwendungen einfach durch Änderung der Vernetzungsnatur auf einen geeigneten (P_{50})-Wert manipuliert werden, indem ein geeignetes natürliches Hämoglobin mit der gewünschten Affinität verwendet wird, oder durch Verwendung eines gentechnisch hergestellten Hämoglobins mit geeigneter Affinität.

[0095] Etliche Arzneimittel sind Kandidaten zur Einkapselung in Hämoglobin-Mikrokugeln der vorliegenden Erfindung. Etliche chemotherapeutische Mittel erfordern das Vorhandensein von Sauerstoff zur maximalen Tumorzytotoxizität. Die Verabreichung solcher Arzneimittel innerhalb Konstrukten eines Sauerstoffträgers wie Hämoglobin verbindet wirkungsvoll die wesentlichen Komponenten der Zytotoxizität in einer einzigen Verpackung. Etliche nützliche zytotoxische Arzneimittel sind öllöslich. Diese Arzneimittel können in einem Fluorkohlenstoff oder anderem biokompatiblen Öl wie Sojaöl, Safloröl, Kokosöl, Olivenöl, Baumwollsamenöl und dergleichen gelöst werden. Die Öl/Arzneimittel-Lösung wird einer Ultraschallbeschallung mit einer Hämoglobinlösung ausgesetzt, um Mikrokugeln von Öl/Arzneimittel innerhalb einer Hülle von vernetztem unlöslichem Hämoglobin herzustellen. Die Suspension kann vor der intravaskulären Verabreichung mit Sauerstoff angereichert werden. Öllösliche zytotoxische Arzneimittel sind Cyclophosphamid, BCNU, Melphalan, Mitomycine, Taxol und Derivate, Taxoter und Derivate, Camptothecin, Adriamycin, Etoposid, Tamoxifen, Vinblastin, Vincristin und dergleichen; nichtsteroidale Entzündungshemmer wie Ibuprofen, Aspirin, Piroxicam, Cimetidin und dergleichen; Steroide wie Östrogen, Prednisolon, Cortison, Hydrocortison, Diflorason und dergleichen; Arzneimittel wie Phenesterin, Mitotan, Visadin, Halonitrosoharnstoffe, Anthrocycline, Ellipticin, Diazepam und dergleichen; immunsuppressive Mittel wie Cyclosporin, Azathioprin, FK506 und dergleichen.

[0096] Wasserlösliche Arzneimittel können auch durch ein Verfahren der Doppel-Emulsion innerhalb der IHC-Hülle eingekapselt werden. Zunächst wird eine wässrige Arzneimittel-Lösung mit einem biokompatiblen Öl emulgiert, um eine Wasser-in-Öl-(W/O-)Emulsion zu erhalten. Die W/O-Emulsion wird als eine Öl-Phase behandelt und, wie oben, einer Ultraschallbeschallung mit einer wässrigen Hämoglobin-Lösung unterzogen, um IHC herzustellen, das innerhalb ihrer Hülle eine Mikro-Emulsion des gewünschten wasserlöslichen Arzneimittels enthält. Emulgatoren, die zur Verwendung in diesem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung vorgesehen sind, enthalten die Pluronics (Blockcopolymere aus Polyethylenoxid und Polypropylenoxid), Phospholipide, aus Eigelb gewonnen (z. B. Ei-Phosphatide, Eigelblecithin und dergleichen); Fettsäureester (z. B. Glycerolmono- und -distearat, Glycerolmono- und -dipalmitat und dergleichen). Wasserlösliche Arzneimittel, die zur Verwendung in diesem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung vorgesehen sind, schließen antineoplastische Arzneimittel wie Actinomycin, Bleomycin, Cyclophosphamid, Duanorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Fluorouracil, Carboplatin, Cisplatin, Interferone, Interleukine, Methotrexat, Mitomycine, Tamoxifen,

Östrogene, Progestogene und dergleichen ein.

[0097] Um das IHC den roten Blutzellen ähnlicher zu machen, kann eine Phospholipid-Doppelschicht um die vernetzten Hämoglobin-Mikroblasen gebildet werden. Solch eine Doppelschicht resultiert in der Bildung eines echten "Erythrozyten-Analogons" und kann in einem zweistufigen Vorgang geschaffen werden. Beladene Phospholipide oder Lipide, die bei der Bildung dieser Doppelschicht verwendet werden, schließen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerol, Sphingomyelin, Dimyristoylphosphatidsäure, Dipalmitoylphosphatidsäure, Sarcosinate (Sarcosinamide), Betaine, monomere und dimere Alkyde und dergleichen ein. Nichtionische Lipide können ebenfalls in dieser Erfindung verwendet werden, einschließlich Polyethylenfettsäureester, Polyethylenfettsäureether, Diethanolamide, langkettige Acylhexosamide, langkettige Acylaminosäureamide, langkettige Aminosäureamine, Polyoxyethylensorbitanester, Polyoxyglycerol-mono- und -diester, Glycerol-mono- und -distearat, Glycerol-mono- und -dioleat, Glycerol-mono- und -dipalmitat und dergleichen.

[0098] Eine weitere Variation dieses Verfahrens besteht darin, photopolymerisierbare Lipide oder Lipide zu verwenden, die leicht durch eine chemische Reaktion vernetzt werden können, um einen stabileren Lipid-"Membran"-Mantel zur Verfügung zu stellen. Photopolymerisierbare Lipide, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, schließen mit Acrylat oder Methacrylat substituierte Lipide (wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Dimyristoylphosphatidsäure, Dipalmitoylphosphatidsäure und dergleichen); Lipide mit natürlicher polymerisierbarer Ungesättigtheit (wie ungesättigte Phosphatidylcholine mit Diacetylengruppen oder konjugierten Diengruppen und dergleichen) usw. ein. Lipide, die leicht mittels eines Thiol-Disulfid-Austausches eine Vernetzung durchmachen können, sind ebenfalls gute Kandidaten zur Bildung eines stabilen Lipid-Mantels für das IHC. Beispiele solcher Lipide schließen Derivate von Phosphatidylcholinen ein, die mit Liponsäure und ähnlichen verestert sind.

[0099] Durch Ultraschallbeschallung synthetisierte IHC können als eine Suspension in einem biokompatiblen Medium verabreicht werden, wie oben beschrieben, wie auch andere Mittel mit Ernähungswert.

[0100] Bevorzugte Wege zur In-vivo-Verabreichung sind: intravenös, intraarteriell, intramuskulär, subkutan, intraperitoneal, oral, durch Inhalation, topisch, transdermal, als Suppositorium, als Pessar und dergleichen.

[0101] Zusammenfassend haben die unlöslichen Hämoglobin-Konstrukte der vorliegenden Erfindung zahlreiche Vorteile gegenüber dem löslichen Hämoglobin des Standes der Technik, dem eingekapselten löslichen Hämoglobin des Standes der Technik sowie den Fluorkohlenstoff-Blutersatzstoffen oder Sauerstoffträgern des Standes der Technik. Diese Vorteile schließen ein:

– höhere Sauerstoff-Kapazität;
– variable Sauerstoff-Affinität;
– unlösliches 'megameres' Hämoglobin, von dem erwartet wird, länger im Kreislauf zu überdauern als trameres oder oligomeres lösliches Hämoglobin des Standes der Technik;
– niedrigere Möglichkeit der Nierengiftigkeit aufgrund der großen Molekülgröße;
– geringere Wahrscheinlichkeit, dass Hämoglobin leckt, als im Falle von in Liposom eingekapseltem Hämoglobin;
– infolge der viel größeren Größe als Liposomen ist die Bildung von Aggregaten, die Komplementproteine stimulieren, unwahrscheinlich;
– verhält sich mehr wie RBC aufgrund der verborgenen "Zell"-Natur, verglichen mit löslichem Hämoglobin des Standes der Technik;
– kann einen Vorrat ungebundenen Sauerstoffs neben Sauerstoff, der an Hämoglobin gebunden ist, tragen;
– kann als Fluorkohlenstoff-(FC-)Träger verwendet werden, ohne möglicherweise allergische und toxische Emulgatoren;
– vernetztes Hämoglobin in Hb/FC-Konstrukten sorgt für verbesserte Stabilität gegenüber emulgierten Systemen des Standes der Technik, die Ei-Phosphatide und/oder andere synthetische oberflächenaktive Substanzen verwenden;
– Sauerstoff-Freisetzungsprofile aus dem Hb/FC sind eine Kombination von S-förmig und linear im Verhältnis zum Gewebe-pO_2;
– Hb/FC-Konstrukte können in vivo nachgewiesen und überwacht werden durch ^{19}F-MRI;
– Hämoglobin- oder Hb/FC-Konstrukte können zusätzlich zum Befördern von Sauerstoff als Arzneimittel-Träger verwendet werden;
– eine Lipid-Doppelschicht-Membran kann bei dem Hämoglobin-Konstrukt Anwendung finden, um es physiologischer erscheinen zu lassen;
– das Hämoglobin-Konstrukt kann mit Polymeren, wie PEG, modifiziert werden, um die intravaskuläre Ver-

weildauer weiter zu erhöhen.

[0102] Die Partikelgröße von polymeren Hüllen, die entsprechend der vorliegenden Erfindung hergestellt sind, haben einen durchschnittlichen Durchmesser von ungefähr 2 μm, was ideal für medizinische Anwendungen ist, da intravenöse oder intraarterielle Injektionen ohne die Gefahr der Blockierung kleiner Blutgefäße und nachfolgender Gewebeschädigung (z. B. verursacht durch Ischämie infolge von Sauerstoff-Verlust) ausgeführt werden können. Zum Vergleich: rote Blutzellen haben einen Durchmesser von ungefähr 8 μm (somit sollte injizierbares Biomaterial kleiner als 8–10 μm im Durchmesser sein, um Blockierungen der Blutgefäße vorzubeugen).

[0103] Entsprechend einem anderen Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wird ein Ansatz für das Problem der Verabreichung von im Wesentlichen wasserunlöslichen Arzneimitteln wie Paclitaxel bereitgestellt, der in der Literatur nicht beschrieben ist. Dieser Ansatz würde die Zufuhr solcher Arzneimittel in verhältnismäßig hohen Konzentrationen erleichtern und dadurch die Anwendung von Emulgatoren mit ihren begleitenden toxischen Nebenwirkungen erübrigen.

[0104] Die oben beschriebene Darreichungsform wird durch neue arzneimittelhaltige Zusammensetzungen erleichtert, wie beansprucht, wobei im Wesentlichen wasserunlösliches Paclitaxel in einer biokompatiblen Flüssigkeit suspendiert ist, und worin die resultierende Suspension Paclitaxel-Partikel mit einer Querschnittsabmessung von nicht größer als ungefähr 10 μm enthält. Die angestrebte Partikelgröße von weniger als ungefähr 10 μm kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden, z. B. Ultraschallbeschallung und dergleichen.

[0105] Aufgrund der Kristallgröße der konventionell hergestellten, im Wesentlichen wasserunlöslichen Arzneimittel wie Paclitaxel, das größer als 20 μm ist, wurden feste Partikel solcher Arzneimittel (z. B. Paclitaxel) nicht in Form einer Suspension in einem Vehikel wie normale Salzlösung zugeführt.

[0106] Aufgrund der mikropartikulären Natur des zugeführten Arzneimittels wird der größte Teil davon durch Organe mit retikuloendothelialen Systemen, wie die Milz, Leber und Lungen, aus dem Kreislauf entfernt. Dies ermöglicht es, pharmakologisch wirksame Mittel in partikulärer Form, auf solche Bereiche im Körper zu richten.

[0107] Die biokompatiblen Flüssigkeiten, vorgesehen zur Anwendung in diesem Ausführungsbeispiel, sind die gleichen wie die oben beschriebenen. Zusätzlich können parenterale Nahrungsmittel wie Intralipid (Handelsname für eine im Handel erhältliche Fett-Emulsion, angewendet als ein parenterales Nahrungsmittel; erhältlich von Kabi Vitrum, Inc., Clayton, North Carolina), Nutralipid (Handelsname für eine im Handel erhältliche Fett-Emulsion, angewendet als ein parenterales Nahrungsmittel; erhältlich von McGaw, Irvine, Kalifornien), Liposyn III (Handelsname für eine im Handel erhältliche Fett-Emulsion, angewendet als ein parenterales Nahrungsmittel (enthält 20% Sojaöl, 1,2% Ei-Phosphatide und 2,5% Glycerin); erhältlich von Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois) und dergleichen als Träger der Arzneimittelpartikel verwendet werden. Alternativ kann, falls die biokompatible Flüssigkeit ein Arzneimittel lösendes Material enthält, wie Sojaöl (z. B. wie im Fall von Intralipid), das Arzneimittel teilweise oder vollständig innerhalb der Trägerflüssigkeit gelöst werden, was seine Verabreichung unterstützt. Derzeit bevorzugte biokompatible Flüssigkeiten zur Anwendung in diesem Ausführungsbeispiel sind parenterale Nahrungsmittel, wie jene oben beschriebenen.

[0108] Die Erfindung wird nun mit Bezug auf die folgenden nicht begrenzenden Beispiele detaillierter beschrieben.

Beispiel 1

Herstellung der Öl enthaltenden Proteinhülle

[0109] Drei Milliliter einer 5%igen USP-(United States Pharmacopoeia)-Humanserumalbumin-Lösung (Alpha Therapeutic Corporation) wurden in ein zylindrisches Gefäß gegeben, das an eine Beschallungssonde (Heat Systems, Modell XL2020) angeschlossen werden konnte. Die Albuminlösung wurde mit 6,5 ml Sojabohnenöl mit USP-Qualität (Sojaöl) überschichtet. Die Spitze der Beschallungssonde wurde an die Grenzfläche zwischen den beiden Lösungen angelegt, und die Anordnung wurde auf 20°C in einem Kühlungsbad gehalten. Dem System wurde ermöglicht zu äquilibrieren, und das Beschallungsgerät wurde für 30 Sekunden eingeschaltet. Es fand ein kräftiges Mischen statt, und eine weiße, milchige Suspension wurde gewonnen. Die Suspension wurde im Verhältnis 1:5 mit normaler Salzlösung verdünnt. Ein Partikelzählgerät (Particle Data Systems, Elzone, Modell 280 PC) wurde verwendet, um die Größenverteilung und Konzentration von Öl enthaltenden Proteinhüllen zu bestimmen. Die resultierenden Proteinhüllen wurden auf eine maximale Querschnitt-

sabmessung von ungefähr 1,35 ± 0,73 µm bestimmt, und die Gesamtkonzentration wurde bestimmt auf ~10^9 Hüllen/ml in der Originalsuspension.

[0110] Zur Kontrolle: die obigen Bestandteile ohne Protein bildeten keine stabile Mikro-Emulsion, als sie der Ultraschallbeschallung unterzogen wurden. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass das Protein zur Bildung von Mikrokugeln notwendig ist. Dies wird durch Rasterelektronenmikroskop- und Elektronenbeugungsaufnahmestudien bestätigt, wie unten beschrieben.

Beispiel 2

Parameter, die die Bildung der polymeren Hülle beeinflussen

[0111] Etliche Variable wie Protein-Konzentration, Temperatur, Beschallungszeit, Konzentration des pharmakologisch wirksamen Mittels und akustische Intensität wurden getestet, um die Bildung der polymeren Hülle zu optimieren. Diese Parameter wurden für vernetzte Rinderserumalbuminhüllen bestimmt, die Toluol enthielten.

[0112] Polymere Hüllen, die aus Lösungen hergestellt wurden, die Proteinkonzentrationen von 1%, 2,5%, 5% und 10% enthielten, wurden mit dem Partikelzählgerät gezählt, um eine Veränderung in der Größe und Anzahl der hergestellten polymeren Hüllen zu bestimmen. Es wurde festgestellt, dass die Größe der polymeren Hüllen nicht stark in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration schwankte, jedoch nahm die Anzahl der polymeren Hüllen je Milliliter der gebildeten "milchigen Suspension" mit der Zunahme der Proteinkonzentration bis zu 5% zu. Oberhalb dieser Konzentration wurde keine signifikante Änderung der Anzahl der polymeren Hüllen beobachtet.

[0113] Es wurde festgestellt, dass die Anfangstemperaturen der Gefäße wichtig für die optimale Herstellung von polymeren Hüllen war. Typischerweise wurden die Eingangsgefäßtemperaturen zwischen 0°C und 45°C gehalten. Die Wasser-Öl-Grenzflächenspannung der für die Bildung der polymeren Hülle verwendeten Öle war ein wichtiger Parameter, der ebenfalls als eine Funktion der Temperatur schwankte. Es wurde festgestellt, dass die Konzentration des pharmakologisch wirksamen Mittels den Ertrag an Proteinhüllen nicht entscheidend beeinflusst. Es ist verhältnismäßig unwichtig, ob das pharmakologisch wirksame Mittel im gelösten Zustand oder im Dispergierungsmittel suspendiert eingebaut wird.

[0114] Die Beschallungszeit war ein wichtiger Faktor bei der Bestimmung der Anzahl an hergestellten polymeren Hüllen je Milliliter. Es wurde festgestellt, dass eine längere Beschallungszeit als drei Minuten eine Abnahme der Gesamtzahl der polymeren Hüllen bewirkte, was eine mögliche Zerstörung von polymeren Hüllen wegen übermäßiger Beschallung anzeigt. Es wurde festgestellt, dass Beschallungszeiten von weniger als drei Minuten angemessene Mengen an polymeren Hüllen herstellen.

[0115] Entsprechend dem Nomogramm, das vom Hersteller des Beschallungsgerätes zur Verfügung gestellt wurde, ist die Nennschallleistung des hier verwendeten Beschallungsgerätes ungefähr 150 Watt/cm^2. Drei Leistungseinstellungen in der Reihenfolge steigender Leistung wurden angewandt, und es wurde festgestellt, dass die größte Anzahl an polymeren Hüllen bei der höchsten Leistungseinstellung hergestellt wurde.

Beispiel 3

Herstellung von polymeren Hüllen, die gelöstes Taxol enthalten

[0116] Taxol wurde in Sojaöl mit USP-Qualität auf eine Konzentration von 2 mg/ml gelöst. 3 ml einer 5%igen USP-Humanserumalbuminlösung wurden in ein zylindrisches Gefäß gegeben, das an eine Beschallungssonde angeschlossen werden konnte. Die Albuminlösung wurde mit 6,5 ml der Sojaöl/Taxol-Lösung überschichtet. Die Spitze der Sonde des Beschallungsgerätes wurde an die Grenzfläche zwischen den zwei Lösungen angelegt, und die Anordnung wurde im Äquilibrium gehalten und das Beschallungsgerät für 30 Sekunden eingeschaltet. Starkes Mischen fand statt, und eine stabile, weiße, milchige Suspension wurde erhalten, die polymere Hüllen mit Proteinwänden enthielt, die die Öl/Taxol-Lösung einschlossen.

[0117] Um eine höhere Beladung mit Arzneimittel in die vernetzte Proteinhülle zu erhalten, kann ein wechselseitiges Lösungsmittel für das Öl und das Arzneimittel (in dem das Arzneimittel eine beträchtlich höhere Löslichkeit hat) mit dem Öl gemischt werden. Vorausgesetzt, dass dieses Lösungsmittel verhältnismäßig ungiftig ist (z. B. Ethylacetat), kann es gemeinsam mit dem ursprünglichen Träger injiziert werden. Andernfalls kann es durch Verdampfen der Flüssigkeit unter Vakuum im Anschluss an die Herstellung der polymeren Hüllen ent-

fernt werden.

Beispiel 4

Stabilität der polymeren Hüllen

[0118] Suspensionen von polymeren Hüllen mit einer bekannten Konzentration wurden bei drei verschiedenen Temperaturen (d. h. 4°C, 25°C und 38°C) auf Stabilität untersucht. Die Stabilität wurde durch Änderung der Partikelzählungen über die Zeit gemessen. Vernetzte Protein-(Albumin-)Hüllen, die Sojabohnenöl (SBO) enthielten, wurden wie oben beschrieben hergestellt (siehe Beispiel 1), in Salzlösung auf eine Ölendkonzentration von 20% verdünnt und bei den obigen Temperaturen gelagert. Partikelzählungen (Elzone), die für jede der Proben als eine Funktion der Zeit gewonnen wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2

Tag	Proteinhüllen (#/ml·10^{10}) in Salzlösung		
	4°C	25°C	38°C
0	7,9	8,9	8,1
1	7,4	6,9	6,8
7	7,3	8,3	5,0
9	7,8	8,1	5,8
17	7,8	8,3	6,1
23	6,9	7,8	7,4
27	7,2	8,8	7,1

[0119] Wie durch die obigen Daten gezeigt, bleibt die Konzentration der gezählten Partikel (d. h. polymeren Hüllen) über die Dauer des Experiments ziemlich konstant. Der Bereich ist ziemlich konstant und verbleibt zwischen ungefähr 7–9·10^{10}/ml, was eine gute Stabilität der polymeren Hülle unter einer Vielfalt von Temperaturbedingungen über beinahe vier Wochen anzeigt.

Beispiel 5

In-vivo-Bioverteilung – Vernetzte Proteinhüllen, die ein Fluorophor enthalten

[0120] Um die Aufnahme und Bioverteilung einer Flüssigkeit, die in Protein-Polymerhüllen eingeschlossen ist, nach der intravenösen Injektion zu bestimmen, wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (Rubren, erhältlich bei Aldrich) innerhalb einer Humanserumalbumin-(HSA)-Protein-Polymerhülle eingeschlossen und als Marker verwendet. Somit wurde Rubren in Toluol gelöst, und vernetzte Albuminhüllen, die Toluol/Rubren enthielten, wurden wie oben beschrieben durch Ultraschallbeschallung hergestellt. Die entstandene milchige Suspension wurde fünfmal in normaler Salzlösung verdünnt. Zwei Milliliter der verdünnten Suspension wurden dann während einer Zeitspanne von 10 Minuten in die Schwanzvene einer Ratte injiziert. Ein Tier wurde eine Stunde nach der Injektion und ein anderes 24 Stunden nach der Injektion geopfert.

[0121] 100 µm-Gefrierschnitte von Lunge, Leber, Niere, Milz und Knochenmark wurden unter einem Fluoresenzmikroskop auf das Vorhandensein von in der Polymerhülle eingeschlossenem Fluoreszenzfarbstoff oder freigesetztem Farbstoff untersucht. Nach einer Stunde schien die Mehrzahl der polymeren Hüllen intakt zu sein (d. h. sie erschienen als hell fluoreszierende Partikel von ungefähr 1 µm Durchmesser) und befand sich in den Lungen und der Leber. Nach 24 Stunden wurde der Farbstoff in Leber, Lungen, Milz und Knochenmark beobachtet. Eine allgemeine Färbung des Gewebes wurde ebenfalls beobachtet, was anzeigte, dass die Hüllenwand der Polymerhüllen sich aufgelöst hatte und der Farbstoff aus dem Inneren freigesetzt worden war. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen und zeigt die mögliche Verwendung der Verbindungen der Erfindung für eine verzögerte oder kontrollierte Freisetzung eines eingeschlossen pharmazeutischen Mittels wie Taxol.

Beispiel 6

Toxizität von polymeren Hüllen, die Sojabohnenöl (SBO) enthalten

[0122] Polymere Hüllen, die Sojaöl enthalten, wurden zubereitet wie in Beispiel 1 beschrieben. Die entstandene Suspension wurde in normaler Salzlösung verdünnt, um zwei unterschiedliche Lösungen herzustellen, eine mit 20% SBO und die andere mit 30% SBO.

[0123] Intralipid, ein im Handel erhältliches TPN-Mittel, enthält 20% SBO. Die LD_{50} von Intralipid in Mäusen beträgt 120 ml/kg oder ungefähr 4 ml für eine Maus mit 30 g, wenn sie mit 1 cm^3/min injiziert wird.

[0124] Zwei Gruppen von Mäusen (drei Mäuse in jeder Gruppe; jede Maus mit einem Gewicht von ungefähr 30 g) wurden mit der SBO enthaltenden Zusammensetzung der Erfindung wie folgt behandelt. Jeder Maus wurden 4 ml der vorbereiteten Suspension SBO enthaltender polymerer Hüllen injiziert. Jedes Mitglied der einen Gruppe erhielt die 20% SBO enthaltende Suspension, während jedes Mitglied der anderen Gruppe die 30% SBO enthaltende Suspension erhielt.

[0125] Alle drei Mäuse in der Gruppe, die die 20% SBO enthaltende Suspension erhielt, überlebten eine solche Behandlung und zeigten bei Beobachtung eine Woche nach der SBO-Behandlung keine starke Toxizität in irgendeinem Gewebe oder Organ. Lediglich eine der drei Mäuse der Gruppe, die die 30% SBO enthaltende Suspension erhielt, starb nach der Injektion. Diese Ergebnisse belegen klar, dass Öl, das in polymeren Hüllen entsprechend der vorliegenden Erfindung enthalten ist, verglichen mit einer im Handel erhältlichen SBO-Zubereitung (Intralipid) bei seiner LD_{50}-Dosis nicht toxisch ist. Diese Wirkung kann der langsamen Freisetzung (d. h. kontrollierte Rate bei der Bioverfügbarwerdung) des Öls aus dem Inneren der polymeren Hülle zugerechnet werden. Solch eine langsame Freisetzung verhindert das Erreichen einer tödlichen Dosis Öl, im Gegensatz zu den hohen Öl-Dosierungen, die mit handelsüblichen Emulsionen erzielt werden.

Beispiel 7

In-vivo-Bioverfügbarkeit von Sojaöl, das aus polymeren Hüllen freigesetzt wurde

[0126] Ein Versuch wurde durchgeführt, um die langsame oder verzögerte Freisetzung von in einer polymeren Hülle eingeschlossenem Material nach der Injektion einer Suspension von polymeren Hüllen in den Blutkreislauf von Ratten zu bestimmen. Vernetzte Protein-(Albumin)-ummantelte polymere Hüllen, die Sojabohnenöl (SBO) enthielten, wurden durch Beschallung, wie oben beschrieben, zubereitet. Die sich ergebende Suspension aus Öl enthaltenden polymeren Hüllen wurde in Salzlösung auf eine Endsuspension verdünnt, die 20% Öl enthielt. Fünf Milliliter dieser Suspension wurden über einen Zeitraum von 10 Minuten in die kanülierte äußere Drosselvene von Ratten injiziert. Diesen Ratten wurde zu etlichen Zeitpunkten im Anschluss an die Injektion Blut entnommen und der Spiegel von Triglyceriden (Sojaöl ist überwiegend Triglycerid) im Blut durch Routine-Analysen bestimmt.

[0127] Fünf Milliliter einer im Handel erhältlichen Fett-Emulsion (Intralipid, ein wässriges parenterales Nahrungsmittel, das 20% Sojaöl, 1,2% Eigelb-Phospholipide und 2,25% Glycerin enthält) wurden als Kontrolle verwendet. Die Kontrolle verwendet Ei-Phosphatid als Emulgator zur Stabilisierung der Emulsion. Ein Vergleich von Serumspiegeln der Triglyceride in den zwei Fällen würde einen direkten Vergleich der Bioverfügbarkeit des Öls als eine Funktion der Zeit geben. Zusätzlich zur Suspension von 20% Öl enthaltenden Polymerhüllen wurden auch 5 ml einer Probe von Öl enthaltenden polymeren Hüllen in Salzlösung mit einer Endkonzentration von 30% Öl injiziert. In jeder der drei Gruppen wurden zwei Ratten verwendet. Die Blutspiegel an Triglyceriden jedes Falles sind in Tabelle 3 aufgezeigt, angegeben in Einheiten von mg/dl.

Tabelle 3

GRUPPE	SERUMTRIGLYCERIDE (mg/dl)					
	Vorher	1 Std.	4 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.
Intralipid-Kontrolle (20% SBO)	11,4	941,9	382,9	15,0	8,8	23,8
Polymerhüllen (20% SBO)	24,8	46,7	43,8	29,3	24,2	43,8
Polymerhüllen (30% SBO)	33,4	56,1	134,5	83,2	34,3	33,9

[0128] Blutspiegel vor Injektion werden in der mit "Vorher" bezeichneten Spalte angegeben. Es ist deutlich, dass sehr hohe Triglycerid-Spiegel im Anschluss an die Injektion bei der Intralipid-Kontrolle zu sehen sind. Es ist dann ersichtlich, dass die Triglycerid-Spiegel ungefähr 24 Stunden benötigen, um bis auf den Spiegel vor der Injektion abzufallen. Somit ist ersichtlich, dass das Öl unverzüglich im Anschluss an die Injektion für den Stoffwechsel zur Verfügung steht.

[0129] Die Suspension von Öl enthaltenden polymeren Hüllen, die die gleiche Menge an Gesamtöl wie Intralipid (20%) enthält, zeigt eine dramatisch andere Verfügbarkeit von nachweisbarem Triglycerid im Serum. Der Spiegel steigt auf ungefähr das Zweifache seines Normalwertes an und wird bei diesem Spiegel für viele Stunden gehalten, was eine langsame oder verzögerte Freisetzung von Triglycerid in das Blut bei recht nahe an die Norm reichenden Spiegeln zeigt. Die Gruppe, die Öl enthaltende Polymerhüllen mit 30% Öl erhielt, zeigt einen höheren Triglycerid-Spiegel (einhergehend mit der höheren verabreichten Dosis), der innerhalb von 48 Stunden auf den Normalstand fällt. Wiederum steigen die Blutspiegel an Triglycerid in dieser Gruppe nicht astronomisch, verglichen mit der Kontrollgruppe, die Intralipid erhielt. Dies wiederum zeigt die langsame und anhaltende Verfügbarkeit des Öls der Zusammensetzung gemäß der Erfindung, was die Vorteile hat, gefährlich hohe Blutspiegel von Material, das in den polymeren Hüllen enthalten ist, zu vermeiden, sowie die Verfügbarkeit über einen ausgedehnten Zeitraum bei annehmbaren Spiegeln. Klar ist, dass in polymeren Hüllen der vorliegenden Erfindung zugeführte Arzneimittel diese gleichen Vorteile erreichen würden.

Beispiel 8

Zubereitung vernetzter proteinummantelter Polymerhüllen, die einen festen Kern eines pharmazeutisch wirksamen Mittels enthalten

[0130] Ein weiteres Verfahren zur Verabreichung eines kaum wasserlöslichen Arzneimittels wie Taxol innerhalb einer polymeren Hülle ist die Herstellung einer Hülle aus polymerem Material um einen festen Arzneimittelkern. Solch ein "proteinummanteltes" Arzneimittel-Partikel kann wie folgt gewonnen werden. Das in Beispiel 3 beschriebene Verfahren wird unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels wiederholt, um Taxol in einer verhältnismäßig hohen Konzentration zu lösen. Üblicherweise verwendete Lösungsmittel sind organische Verbindungen wie Benzol, Toluol, Hexan, Ethylether und dergleichen. Polymere Hüllen werden wie in Beispiel 3 hergestellt. Fünf Milliliter der milchigen Polymerhüllen-Suspension, die gelöstes Taxol enthalten, werden auf 10 ml in normaler Salzlösung verdünnt. Diese Suspension wird in einen Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur gegeben, und die flüchtige organische Verbindung wird durch Vakuum entfernt. Nach ungefähr 2 Stunden im Rotationsverdampfer werden diese Polymerhüllen unter einem Mikroskop geprüft, um undurchsichtige Kerne zu zeigen, was die Entfernung von im Wesentlichen dem gesamten organischen Lösungsmittel und das Vorhandensein festen Taxols innerhalb einer Proteinhülle anzeigt.

[0131] Alternativ werden die Polymerhüllen mit Kernen aus organisches Lösungsmittel enthaltendem gelöstem Arzneimittel gefriergetrocknet, um ein trockenes, krümeliges Pulver zu erhalten, das in Salzlösung (oder anderer geeigneter Flüssigkeit) zum Zeitpunkt des Gebrauchs resuspendiert werden kann. Im Falle anderer Arzneimittel, die bei Raumtemperatur nicht im festen Zustand sein könnten, wird eine Polymerhülle mit einem flüssigen Kern gewonnen. Dieses Verfahren ermöglicht die Herstellung einer vernetzten proteinummantelten Hülle, die ein unverdünntes Arzneimittel enthält. Die Analyse der Partikelgröße zeigt, dass diese polymeren Hüllen kleiner sind als jene, die Öl enthalten. Obwohl das derzeit bevorzugte Protein für die Verwendung in der Herstellung der polymeren Hülle Albumin ist, können andere Proteine wie α-2-Makroglobulin, ein bekanntes Opsonin, verwendet werden, um die Aufnahme der polymeren Hüllen durch makrophagenähnliche Zellen zu verbessern. Alternativ dazu könnte ein PEG-Sulfhydryl (unten beschrieben) während der Bildung der polyme-

ren Hülle hinzugefügt werden, um eine polymere Hülle mit erhöhter Zirkulationszeit in vivo herzustellen.

Beispiel 9

In-vivo-Zirkulation und Freisetzungskinetik der Polymerhüllen

[0132] Polymerhüllen mit festem Kern, die Taxol enthalten, wurden wie oben beschrieben bereitet (siehe z. B. Beispiel 3) und in normaler Salzlösung suspendiert. Die Taxol-Konzentration in der Suspension wurde wie folgt mittels HPLC gemessen. Zunächst wurde das Taxol in der Polymerhülle durch Zugabe von 0,1 M Mercaptoethanol freigesetzt (was den Austausch von Protein-Disulfid-Vernetzungen sowie das Zusammenbrechen der Vernetzung der Polymerhülle zur Folge hatte), dann wurde das freigesetzte Taxol mit Acetonitril aus der Suspension extrahiert. Die sich ergebende Mischung wurde zentrifugiert, und der Überstand wurde gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in Methanol gelöst und auf eine HPLC-Säule injiziert, um die Konzentration von Taxol in der Suspension zu bestimmen. Die Taxol-Konzentration wurde als ungefähr 1,6 mg/ml festgestellt.

[0133] Ratten wurden durch einen Jugularkatheter 2 ml dieser Suspension injiziert. Das Tier wurde nach zwei Stunden geopfert und die Menge an in der Leber vorhandenem Taxol durch HPLC bestimmt. Dies erforderte die Homogenisation der Leber, gefolgt von der Extraktion mit Acetonitril und Lyophilisierung des Überstandes im Anschluss an die Zentrifugierung. Das Lyophilisat wurde in Methanol gelöst und auf eine HPLC-Säule injiziert. Ungefähr 15% der verabreichten Taxol-Dosis wurden nach zwei Stunden von der Leber wiedergewonnen, was eine signifikante Dosierung an die Leber zeigt. Dieses Ergebnis stimmt mit der bekannten Funktion des retikuloendothelialen Systems der Leber hinsichtlich der Entfernung kleiner Partikel aus dem Blut überein.

Beispiel 10

Herstellung von vernetzten PEG-ummantelten polymeren Hüllen

[0134] Als eine Alternative zur Verwendung von Thiol (Sulfhydryl) enthaltenden Proteinen bei der Bildung von oder als Additiv zu polymeren Hüllen der Erfindung wurde ein Thiol enthaltendes PEG hergestellt. PEG ist bekannt als nicht toxisch, nichtentflammbar, nichthaftend an Zellen und im Allgemeinen biologisch inert. Es wurde an Proteine gebunden, um deren Antigenität zu reduzieren, und an Liposom bildende Lipide, um deren Zirkulationszeit in vivo zu erhöhen. Somit würde erwartet, dass der Einbau von PEG in eine vorwiegend aus Proteinen bestehende Hülle sowohl die Zirkulationszeit als auch die Stabilität der polymeren Hülle erhöht. Durch Variieren der Konzentration von PEG-Thiol, das der 5%igen Albuminlösung hinzugefügt wurde, war es möglich, polymere Hüllen mit variierenden Stabilitäten in vivo zu gewinnen. PEG-Thiol wurde durch Arbeitsverfahren hergestellt, die in der Literatur zugänglich sind (wie das Verfahren von Harris und Herati, wie beschrieben in Polymer Preprints Vol. 32: 154–155 (1991)).

[0135] PEG-Thiol mit einem Molekulargewicht von 2000 g/mol wurde auf eine Konzentration von 1% (0,1 g wurden 10 ml hinzugefügt) in einer 5%igen Albuminlösung gelöst. Diese Protein/PEG-Lösung wurde mit Öl überschichtet, wie in Beispiel 1 beschrieben, und beschallt, um Öl enthaltende polymere Hüllen mit Wänden, die vernetztes Protein und PEG enthalten, herzustellen. Diese polymeren Hüllen wurden auf Stabilität geprüft, wie in Beispiel 4 beschrieben.

[0136] Andere synthetische wasserlösliche Polymere, die mit Thiol-Gruppen modifiziert werden können und anstelle von PEG verwendet werden könnten, schließen zum Beispiel Polyvinylalkohol, Polyhydroxyethylmethacrylat, Polyacrylsäure, Polyethyloxazolin, Polyacrylamid, Polyvinylpyrrolidinon, Polysaccharide (wie Chitosan, Alginate, Hyaluronsäure, Dextrane, Stärke, Pektin und dergleichen) und dergleichen ein.

[0137] Zum Beispiel wurden Fluorkohlenstoff enthaltende Proteinhüllen, die verlängerte Zirkulationszeiten in vivo haben, als besonders vorteilhaft zur Bildgebung des Gefäßsystems erkannt. Diese Hüllen verblieben für verlängerte Zeiträume innerhalb der Zirkulation, im Verhältnis zu Hüllen, die kein PEG in den Hüllenwänden enthielten. Dies erlaubte zum Beispiel die Sichtbarmachung der kardialen Zirkulation und stellte ein nicht invasives Mittel zur Beurteilung der Coronar-Zirkulation zur Verfügung, anstatt konventionelle invasive Verfahren, wie Angiographie, zu verwenden.

Beispiel 11

Ausrichten immunsuppressiver Mittel auf transplantierte Organe unter Verwendung der intravenösen Zufuhr von polymeren Hüllen, die solche Mittel enthalten

[0138] Immunsuppressive Mittel werden ausgedehnt verwendet nach Organtransplantationen zur Vorbeugung von Abstoßungsvorfällen. Insbesondere verlängert Cyclosporin, ein hochwirksames immunsuppressives Mittel, das Überleben von allogenen Transplantaten, einbegriffen Haut, Herz, Niere, Bauchspeicheldrüse, Knochenmark, Dünndarm und Lunge, in Tieren. Von Cyclosporin wurde gezeigt, dass es eine gewisse humorale Immunität und in noch größerem Maße zellvermittelte Reaktionen, wie die Abstoßung allogener Transplantate, verzögerte Überempfindlichkeit, experimentelle allergische Encephalomyelitis, Freund-Adjuvans-Arthritis und Graft-versus-Host-Reaktion bei vielen Tierarten hinsichtlich einer Vielzahl von Organen unterdrückt. Erfolgreiche allogene Nieren-, Leber- und Herz-Transplantate wurden unter Verwendung von Cyclosporin an Menschen durchgeführt.

[0139] Cyclosporin wird derzeit oral verabreicht, entweder als Kapseln, die eine Lösung von Cyclosporin in Alkohol und Öle wie Maisöl, polyoxyethylierte Glyceride und dergleichen enthalten, oder als eine Lösung in Olivenöl, polyoxyethylierten Glyceriden und dergleichen. Es wird auch durch intravenöse Injektion verabreicht, wobei es in einer Lösung aus Ethanol (ungefähr 30%) und Cremaphor (polyoxyethyliertes Rizinusöl) gelöst ist, die vor der Injektion in normaler Salzlösung oder 5% Dextrose im Verhältnis 1:20 bis 1:100 verdünnt werden muss. Verglichen mit einer intravenösen (i. v.) Infusion beträgt die absolute Bioverfügbarkeit der oralen Lösung ungefähr 30% (Sandoz Pharmaceutical Corporation, Publikation SDI-Z10 (A4), 1990). Im Allgemeinen leidet die i. v.-Verabreichung von Cyclosporin unter ähnlichen Schwierigkeiten wie die derzeit praktizierte i. v.-Verabreichung von Taxol, d. h. anaphylaktischen und allergischen Reaktionen, von denen angenommen wird, dass sie auf das Cremaphor, das Transportmittel, das für die i. v.-Formulierung verwendet wird, zurückzuführen sind. Ferner verhindert die intravenöse Zufuhr von Arzneimitteln (z. B. Cyclosporik), eingekapselt wie hierin beschrieben, gefährliche Spitzen-Blutspiegel unmittelbar nach der Arzneimittelgabe. Zum Beispiel zeigte ein Vergleich von derzeit erhältlichen Formulierungen für Cyclosporin mit der oben beschriebenen eingekapselten Form von Cyclosporin eine fünffache Abnahme der Spitzen-Blutspiegel von Cyclosporin unmittelbar nach der Injektion.

[0140] Um Schwierigkeiten im Zusammenhang mit Cremaphor zu vermeiden, kann Cyclosporin, das in Polymerhüllen, wie oben beschrieben, enthalten ist, durch i. v.-Injektion verabreicht werden. Es kann in einem biokompatiblen Öl oder einer Reihe anderer Lösungsmittel gelöst werden, woraufhin es durch Beschallung in polymere Hüllen dispergiert werden kann, wie oben beschrieben. Zusätzlich hat die Verabreichung von Cyclosporin (oder anderer immunsuppressiver Mittel) in polymeren Hüllen den Vorteil des lokalen Targetings wegen der Aufnahme des injizierten Materials in die Leber durch das RES-System. Dies kann bis zu einem gewissen Ausmaß systemische Toxizität verhindern und wirkungsvolle Dosierungen aufgrund des lokalen Targetings reduzieren. Die Wirksamkeit der Verabreichung und des Targetings des in Polymerhüllen enthaltenen Taxols an die Leber nach der intravenösen Injektion ist in Beispiel 9 gezeigt. Ein ähnliches Ergebnis würde erwartet hinsichtlich der Verabreichung von Cyclosporin (oder anderer mutmaßlich immunsuppressiver Mittel) entsprechend der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 12

Antikörper-Targeting von polymeren Hüllen

[0141] Die Natur der polymeren Hüllen der Erfindung erlaubt das Anheften monoklonaler oder polyklonaler Antikörper an die polymere Hülle oder den Einbau von Antikörpern in die Polymerhülle. Antikörper können in die polymere Hülle eingebaut werden, wenn die polymere Mikrokapsel-Hülle gebildet wird, oder Antikörper können an die polymere Mikrokapsel-Hülle nach deren Herstellung angeheftet werden. Standard-Protein-Immobilisierungsverfahren können für diesen Zweck angewandt werden. Zum Beispiel steht mit Protein-Mikrokapseln, die aus einem Protein, wie Albumin, hergestellt werden, eine große Zahl von Aminogruppen auf den Albumin-Lysin-Resten für das Anhängen von geeignet modifizierten Antikörpern zur Verfügung. Als ein Beispiel können Anti-Tumormittel einem Tumor zugeführt werden durch Einschluss von Antikörpern gegen den Tumor in die polymere Hülle, während sie gebildet wird, oder es können Antikörper gegen den Tumor an die polymere Mikrokapselhülle nach deren Herstellung angehängt werden. Als ein weiteres Beispiel können Genprodukte speziellen Zellen zugeführt werden (z. B. Hepatozyten oder bestimmten Stammzellen im Knochenmark) durch Einbau von Antikörpern gegen Rezeptoren auf den Zielzellen in die Polymerhülle, während sie gebildet wird, oder Antikörper gegen Rezeptoren auf den Zielzellen können an die polymere Mikrokapselhülle

nach deren Herstellung angehängt werden. Zusätzlich können monoklonale Antikörper gegen Kernrezeptoren verwendet werden, um das eingekapselte Produkt zielgenau auf den Nukleus bestimmter Zelltypen zu richten.

Beispiel 13

Polymere Hüllen als Träger für Polynukleotidkonstrukte, Enzyme und Vakzine

[0142] Mit zunehmender Akzeptanz der Gentherapie als eine durchführbare therapeutische Option (derzeit wurden mehr als 40 Vorschläge zum menschlichen Gen-Transfer von NIH- und/oder FDA-Prüfungsausschüssen angenommen) ist eine der zu überwindenden Barrieren bei der Einführung dieses therapeutischen Ansatzes die Abneigung, virale Vektoren für den Einbau genetischen Materials in das Genom einer menschlichen Zelle zu verwenden. Viren sind schon an sich toxisch. Somit sind die Risiken, die die Verwendung viraler Vektoren in der Gentherapie mit sich bringt, insbesondere für die Behandlung von nicht lebensbedrohlichen, nicht erblich bedingten Krankheiten inakzeptabel. Leider werden Plasmide, die ohne Verwendung eines viralen Vektors übertragen werden, üblicherweise nicht in das Genom der Zielzelle eingebaut. Ferner haben solche Plasmide, wie konventionelle Arzneimittel, eine begrenzte Halbwertszeit im Körper. Somit war eine generelle Begrenzung der Einführung einer Gentherapie (wie auch Antisense-Therapie, die eine Umkehrform der Gentherapie ist, bei der eine Nukleinsäure oder ein Oligonukleotid eingeführt wird, um eine Genexpression zu hemmen) die Unmöglichkeit, Nukleinsäuren oder Oligonukleotide wirksam zuzuführen, die zu groß sind, um die Zellmembran zu durchdringen.

[0143] Die Einkapselung von DNA, RNA, Plasmiden, Oligonukleotiden, Enzymen und dergleichen in Protein-Mikrokapselhüllen, wie hierin beschrieben, kann ihre gezielte Zufuhr an die Leber, die Lunge, die Milz, die Lymphe und das Knochenmark erleichtern. Somit können solche biologischen Mittel entsprechend der vorliegenden Erfindung intrazellulären Orten zugeführt werden, ohne die begleitende Gefahr, die mit der Verwendung viraler Vektoren verbunden ist. Diese Art der Formulierung erleichtert die nicht-spezifische Aufnahme oder Endozytose der polymeren Hüllen direkt aus dem Blutstrom in die Zellen des RES, in Muskelzellen durch intramuskuläre Injektion, oder durch direkte Injektion in Tumoren. Ferner können monoklonale Antikörper gegen Kernrezeptoren verwendet werden, um das eingekapselte Produkt auf den Nukleus bestimmter Zelltypen zu richten.

[0144] Krankheiten, die von solchen Konstrukten zum Ziel genommen werden können, schließen Diabetes, Hepatitis, Hämophilie, zystische Fibrose, multiple Sklerose, Krebserkrankungen im Allgemeinen, Grippe, AIDS und dergleichen ein. Zum Beispiel kann das Gen des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF I) in Protein-Mikrokapselhüllen eingekapselt werden zur Verabreichung bei der Behandlung von diabetischer peripherer Neuropathie und Kachexie. Die Gene, die Faktor IX und Faktor VIII kodieren (nützlich für die Behandlung von Hämophilie), können auf die Leber gerichtet werden durch Einkapselung in Protein-Mikrokapselhüllen der vorliegenden Erfindung. Ähnlich kann das Gen für den Low-Density-Lipoprotein-(LDL-)Rezeptor auf die Leber gerichtet werden zur Behandlung der Atherosklerose durch Einkapselung in Protein-Mikrokapselhüllen der vorliegenden Erfindung.

[0145] Andere Gene, die in der Praxis der vorliegenden Erfindung nützlich sind, sind Gene, die die Immunantwort des Körpers gegen Kebszellen restimulieren. Zum Beispiel können Antigene, wie HLA-B7, kodiert durch eine in einem Plasmid enthaltene DNA, in eine Protein-Mikrokapselhülle der vorliegenden Erfindung eingebaut werden zur Injektion direkt in einen Tumor (wie einen Hautkrebs). Einmal im Tumor, wird das Antigen für den Tumor spezifische Zellen rekrutieren, die den Spiegel von Zytokinen (z. B. IL-2) anheben, die den Tumor zum Ziel für einen Angriff des Immunsystems machen.

[0146] Als ein weiteres Beispiel sind Plasmide, die Teile des adeno-assoziierten Virusgenoms enthalten, zur Einkapselung in Protein-Mikrokapselhüllen der vorliegenden Erfindung vorgesehen. Zusätzlich können Protein-Mikrokapselhüllen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um therapeutische Gene zu CD8+ T-Zellen zu bringen für eine ergriffene Immuntherapie gegen eine Vielzahl von Tumoren und Infektionskrankheiten.

[0147] Protein-Mikrokapselhüllen der vorliegenden Erfindung können ebenso verwendet werden als ein Verabreichungssystem im Kampf gegen Infektionskrankheiten über die gezielte Zufuhr eines Antisense-Nukleotids, zum Beispiel gegen das Hepatitis-B-Virus. Ein Beispiel solch eines Antisense-Oligonukleotids ist ein 21-mer Phosphorothioat gegen das Polyadenylierungssignal des Hepatitis-B-Virus.

[0148] Protein-Mikrokapselhüllen der vorliegenden Erfindung können auch zur Verabreichung des Zystische-Fibrose-Transmembran-Regulator-(CFTR-)Gens verwendet werden. Menschen, denen dieses Gen fehlt,

entwickeln zystische Fibrose, die durch Zerstäuben von Protein-Mikrokapselhüllen der vorliegenden Erfindung, die das CFTR-Gen enthalten, und direkte Inhalation in die Lungen behandelt werden kann.

[0149] Enzyme können unter Verwendung der Protein-Mikrokapselhüllen der vorliegenden Erfindung ebenfalls verabreicht werden. Zum Beispiel kann das Enzym DNase eingekapselt und der Lunge zugeführt werden. Ähnlich können Ribozyme eingekapselt werden und auf Virus-Hüllproteine oder virusinfizierte Zellen gerichtet werden, indem geeignete Antikörper an das Äußere der polymeren Hülle angeheftet werden. Impfstoffe können ebenso in polymere Mikrokapseln der vorliegenden Erfindung eingekapselt werden und zur subkutanen, intramuskulären oder intravenösen Verabreichung verwendet werden.

Beispiel 14 (Vergleichsbeispiel)

Herstellung von unlöslichen Hämoglobin-Konstrukten (IHC) zur Verwendung als Ersatzstoff für rote Blutzellen

[0150] Eine 20-ml-Glas-Reaktionszelle, Titanhorn und Kragen wurden vor der Synthese mit Alkohol und steriler Salzlösung gewaschen, wie auch die gesamte verwendete Ausrüstung. In einer typischen Reaktion wurden 3,5 ml Hämoglobin (menschliches oder vom Rind) mit 5 Gew.-% pro Volumeneinheit zu einer Reaktionszelle hinzugefügt, die an das Ultraschallhorn angeschlossen war (Heat Systems XL2020, 20 kHz, 400 W Maximalleistung). Das Horn und die Zelle wurden dann in ein temperaturkontrolliertes Bad getaucht, dessen Temperatur auf 55°C eingestellt war. Reaktionen, die bei 55°C durchgeführt wurden, schienen optimal, jedoch kann das Produkt in einem breiten Temperaturbereich (0 bis 80°C) synthetisiert werden. Der pH-Wert betrug 6,8. Die Temperaturkontrolle ist entscheidend für hohe Materialerträge, und die optimale Temperatur hängt von der spezifischen Konfiguration des Experiments ab. Die Ultraschallquelle schaltete sich bei einer Leistungseinstellung von 7 ein. Das Nomogramm des Herstellers empfahl eine Ausgangsleistung von ungefähr 150 W/cm^2. Die Reaktion ist nach ungefähr 30 Sekunden abgeschlossen. Erträge bei kürzeren oder längeren Reaktionszeiten scheinen geringer zu sein. Für das Rinder-Hämoglobin wurde die Lösung mit 2,5 Gew.-% pro Volumeneinheit durch eine Sephadex-G-25-Gel-Permeationssäule geschleust, um sämtliche Anionen, wie Phosphate, zu entfernen. In einer typischen Synthese von menschlichem Hämoglobin-IHC wurde das Ultraschallhorn an der Luft/Wasser-Grenzfläche positioniert. Die hergestellte homogene Suspension enthält proteinöse rote Blutzellen. Die wässrige Suspension kann dann in einem sterilen Behälter bei 4°C gelagert werden.

[0151] Eine typische Reaktion ergibt eine Lösung, die ungefähr 3×10^8 IHC-Hüllen je Milliliter enthält mit einem durchschnittlichen Hüllendurchmesser von 3 µm und einer Standardabweichung von 1 µm. Dieses synthetische Verfahren ergibt hohe Konzentrationen von Biomaterial in Mikrometergrößen mit engen Größenverteilungen.

[0152] Nach der Synthese verbleiben die IHC als eine Suspension in der natürlichen Proteinlösung. Um das IHC von dem nicht umgesetzten Protein zu trennen, wurden etliche Verfahren angewandt: Filtration, Zentrifugieren und Dialyse. Das erste Verfahren schloss das Filtern der Mischung durch einen Anotop-Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm im Durchmesser (Whatman, Inc.) ein. Der Filter wurde mit etlichen Volumen Wasser gewaschen, bis das Filtrat sehr wenig oder kein Protein enthielt (wie mittels UV-VIS-Spektroskopie festgestellt). Die IHC wurden aus dem Filter "rückgewaschen" und in einem äquivalenten Volumen Salzlösung resuspendiert. Das zweite Reinigungsverfahren bezog die Verwendung eines Centricon-Zentrifugenfilters mit einem Molekulargewichtsrückhaltevermögen von 100 Kilodalton (kD) ein. Der Zentrifugenfilter ist ein Zentrifugenröhrchen, das durch eine Filtermembran in der Mitte abgetrennt ist. Das Zentrifugieren der IHC-Lösung bei 1000 G für die Dauer von 5 Minuten ermöglichte, dass das meiste des nicht umgesetzten Hämoglobins (64,5 kD) die Membran passieren konnte. Schließlich wurde auch Dialyse mit einer Membran für hohes Molekulargewicht (300 kD) verwendet, um das IHC zu reinigen. Jedoch benötigte dieses Verfahren ungefähr zwei Dialyse-Tage. Das bevorzugte Verfahren zur Reinigung des IHC ist das der Centricon-Zentrifugation.

Beispiel 15 (Vergleichsbeispiel)

Herstellung eines unlöslichen Hämoglobin/Albumin-Konstrukts (IHAC) als Ersatz für rote Blutzellen

[0153] Eine 20-ml-Glas-Reaktionszelle, Titanhorn und Kragen wurden vor der Synthese mit Alkohol und steriler Salzlösung gewaschen, wie auch die gesamte verwendete Ausrüstung. In einer typischen Reaktion wurden 3,5 ml Hämoglobin und Albumin (menschliches oder vom Rind; das Hämoglobin/Albumin-Verhältnis schwankte von 0,5 bis 2) mit 5 Gew.-% pro Volumeneinheit in eine Reagenzzelle gegeben, die an ein Ultraschallhorn angeschlossen war (Heat Systems XL2020, 20 KHz, 400 W Maximalleistung). Das Horn und die Zelle wurden dann in ein temperaturkontrolliertes Bad mit einer auf 55°C eingestellten Temperatur getaucht.

Reaktionen, die bei 55°C durchgeführt wurden, erschienen optimal, jedoch kann das Produkt in einem breiten Temperaturbereich synthetisiert werden (0 bis 80°C). Der pH-Wert betrug 6,8. Die Temperaturkontrolle ist entscheidend für hohe Materialerträge, und die optimale Temperatur hängt von der spezifischen Konfiguration des Experiments ab. Die Ultraschallquelle schaltete sich bei einer Leistungseinstellung von 7 ein. Das Nomogramm des Herstellers empfahl eine Ausgangsleistung von ungefähr 150 W/cm^2. Die Reaktion ist nach ungefähr 30 Sekunden abgeschlossen. Erträge bei kürzeren und längeren Reaktionszeiten scheinen geringer zu sein. Die hergestellte homogene Suspension enthält den proteinösen Ersatzstoff für rote Blutzellen. Die wässrige Suspension wurde gefiltert, gewaschen, in steriler gepufferter Salzlösung resuspendiert und in einem sterilen Behälter bei 4°C gelagert.

[0154] Wiederum, wie oben beschrieben, ergibt eine typische Reaktion eine Lösung, die grob geschätzt 10^8 Hüllen je Milliliter enthält mit einem durchschnittlichen Hüllendurchmesser von 3 µm und einer Standardabweichung von 1 µm. Dieses synthetische Verfahren ergibt hohe Konzentrationen von Biomaterial in Mikrometergrößen mit engen Größenverteilungen.

[0155] Als Alternative kann ein Durchfluss-System verwendet werden, das die kontinuierliche Bearbeitung des IHC ermöglicht. Solch ein System besteht aus peristaltisch arbeitenden Pumpen, die kontinuierlich Ströme aus Hämoglobin und wahlweise einem biokompatiblen Öl oder Fluorkohlenstoff in ein Reagenzgefäß mit einer Beschallungssonde pumpen. Eine geeignete Verweildauer wird im Gefäß beibehalten und das IHC durch Überlauf vom Gefäß in einen Rückgewinnungstank wiedergewonnen. Die nicht umgesetzte Hämoglobinlösung wird in das Reagenzgefäß zurückgeführt.

Beispiel 16 (Vergleichsbeispiel)

Herstellung unlöslicher Hämoglobin-Konstrukte, die eingekapselte Fluorkohlenstoffe enthalten

[0156] Eine 20-ml-Glas-Reaktionszelle, Titanhorn und Kragen wurden vor der Synthese mit Alkohol und steriler Salzlösung gewaschen, wie auch die gesamte verwendete Ausrüstung. In einer typischen Reaktion wurden 3,5 ml eines Hämoglobins (menschliches oder vom Rind) mit 5 Gew.-% pro Volumeneinheit in eine Reagenzzelle gegeben, die an das Ultraschallhorn (Heat Systems XL2020, 20 kHz, 400 W Maximalleistung) angeschlossen wurde. 3,5 ml eines Fluorkohlenstoffes, Perfluordecalin, wurden in das Reagenzgefäß gegeben. Das Horn und die Zelle wurden dann in ein temperaturkontrolliertes Bad mit einer auf 20°C eingestellten Temperatur getaucht. Der pH-Wert der wässrigen Phase betrug 6,8. Die Ultraschallquelle schaltete sich bei einer Leistungseinstellung von 7 ein. Das Nomogramm des Herstellers empfahl eine Ausgangsleistung von ungefähr 150 W/cm^2. Die Reaktion ist nach ungefähr 30 Sekunden abgeschlossen. Die hergestellte homogene Suspension enthält die Mikrokapseln oder Mikrokugeln von vernetzten unlöslichen Hämoglobinhüllen mit eingekapseltem Perfluordecalin im Innern. Die milchige Suspension wird, wie oben, gefiltert, gewaschen, in steriler gepufferter Salzlösung resuspendiert und in einem sterilen Behälter bei 4°C gelagert.

[0157] Wiederum, wie oben beschrieben, ergibt eine typische Reaktion eine Lösung, die grob 10^8 Hüllen je Milliliter enthält mit einem durchschnittlichen Hüllendurchmesser von 3 µm und einer Standardabweichung von 1 µm. Dieses Syntheseverfahren ergibt hohe Konzentrationen von Biomaterial in Mikrometergrößen mit engen Größenverteilungen.

Beispiel 17 (Vergleichsbeispiel)

Herstellung von unlöslichen Albumin-Konstrukten, die eingekapselte Fluorkohlenstoffe enthalten

[0158] Eine 20-ml-Glas-Reaktionszelle, Titanhorn und Kragen wurden vor der Synthese mit Alkohol und steriler Salzlösung gewaschen, wie auch die gesamte verwendete Ausrüstung. In einer typischen Reaktion wurden 3,5 ml Albumin (menschliches oder vom Rind) mit 5 Gew.-% pro Volumeneinheit in eine Reaktionszelle gegeben, die an das Ultraschallhorn angeschlossen war (Heat Systems XL2020, 20 kHz, 400 W Maximalleistung). 3,5 ml eines Fluorkohlenstoffes, Perfluordecalin (oder Perfluortripropylamin), wurden in das Reagenzgefäß gegeben. Das Horn und die Zelle wurden dann in ein temperaturkontrolliertes Bad mit einer auf 20°C eingestellten Temperatur getaucht. Der pH-Wert der wässrigen Phase betrug 6,8. Die Ultraschallquelle schaltete sich bei einer Leistungseinstellung von 7 ein. Das Nomogramm des Herstellers empfahl eine Ausgangsleistung von ungefähr 150 W/cm^2. Die Reaktion ist nach ungefähr 30 Sekunden abgeschlossen. Die hergestellte homogene Suspension enthält die Mikrokapseln oder Mikrokugeln von vernetzten unlöslichen Albuminhüllen mit eingekapseltem Perfluordecalin (oder Perfluortripropylamin) im Innern. Die milchige Suspension wird, wie oben, gefiltert, gewaschen, in steriler gepufferter Salzlösung resuspendiert und in einem sterilen Behälter

bei 4°C gelagert.

[0159] Wiederum, wie oben beschrieben, ergibt die typische Reaktion eine Lösung, die grob 10^8 Hüllen je Milliliter enthält mit einem durchschnittlichen Hüllendurchmesser von 3 μm und einer Standardabweichung von 1 μm. Dieses Syntheseverfahren ergibt hohe Konzentrationen von Biomaterial in Mikrometergrößen mit engen Größenverteilungen.

Beispiel 18

Unlösliche Hämoglobin-Konstrukte, zusätzlich mit allosterischen Modifikatoren modifiziert, wie Pyridoxal-5'-phosphat (PLP)

[0160] Um Hämoglobin-Konstrukte mit variablen Affinitäten zu Sauerstoff (d. h. variable P_{50}) zu erhalten, wurden die IHC weiter mit PLP zur Reaktion gebracht, einem bekannten allosterischen Modulator. Einer Suspension von IHC (gewonnen wie in Beispiel 14) in Trispuffer wurde bei 10°C unter Stickstoff der Sauerstoff entzogen. 10 ml der reduzierten IHC-Suspension wurden in jedes von sechs getrennten Reagenzgefäßen gegeben. Unterschiedliche molare PLP/Hb-Verhältnisse wurden in jedes der Gefäße hinzugefügt. Sie betrugen 0,1/3,0, 0,75/3,0, 1,5/3,0, 3,0/3,0, 4,2/3,0, 6,0/3,0. Nach 30 Minuten wurde ein zehnfacher Natriumborhydrid-Überschuss hinzugefügt und es wurde ermöglicht, die Schiffsche Base für die Dauer von weiteren 30 Minuten zu reduzieren. Die Suspension wurde dann durch Zentrifugieren gefiltert, dreimal mit gepufferter Salzlösung rückgespült, in gepufferter Salzlösung resuspendiert und bei 4°C gelagert. Diese Modifizierung hat die endständigen Aminogruppen der b-Globinkette in Desoxy-Hämoglobin zum Ziel. In dieser Hinsicht ahmt die Modifizierung stark die Wirkung von 2,3-DPG (der am Lysin-EF6(82)b bindet) bei der Stabilisierung der Desoxykonformation nach.

[0161] Die sechs verschiedenen Grade der Modifizierung werden zu IHC mit ansteigenden P_{50}-Werten führen (abnehmende Sauerstoff-Affinitäten) mit steigendem Grad der PLP-Substitution.

Beispiel 19

Unlösliche Konstrukte mit vernetzten Hüllen aus Hämoglobin und Polyethylenglykol

[0162] Polyethylenglykol (PEG) ist bekannt als nicht toxisch, nichtentflammbar, nichthaftend an Zellen und im Allgemeinen biologisch inert. Proteine, die an PEG angehängt worden sind, wurden als weniger antigen befunden. Es wurde beobachtet, dass bei Liposomen die Zirkulation nach Bindung/Einschluss von PEG erhöht war. Somit wird damit gerechnet, dass der Einbau von PEG in die RBC die Zirkulationszeit erhöht. Durch Variieren der Konzentration von PEG-Thiol, das dem Protein (z. B. Hämoglobin) hinzugefügt wurde, war es möglich, PEG-Hämoglobin-RBC herzustellen, das variierende Stabilitäten aufwies. Das PEG-Thiol wurde durch Verfahren, wie in der Literatur beschrieben (wie Harris and Heart, Polymer Preprints 32: 154 (1991), hergestellt.

[0163] PEG-Thiol mit einem Molekulargewicht von 2000 g/mol wurde auf eine Konzentration von 1% (0,1 g auf 10 ml) in einer 5%igen Hämoglobin-Lösung gelöst. Die Protein-PEG-Lösung wurde beschallt, um den proteinhaltigen Ersatz für rote Blutzellen, wie in Beispiel 14 beschrieben, zu bilden.

Beispiel 20

Unlösliche Hämoglobin-Konstrukte mit Polyethylenglykol, kovalent an das Hüllenäußere angeheftet

[0164] Die IHC wurden, wie in Beispiel 14 beschrieben, hergestellt. Polyethylenglykol mit einem MW von 10.000 (PEG 10k) wurde mit 1,1'-Carbonyldiimidazol CDI entsprechend Verfahren, die in der Literatur zugänglich sind (Beauchamp et al. Analytical Biochemistry 131: 25–33, 1983), zur Reaktion gebracht. Die IHC wurden in 50 mM Borat-Puffer pH 8,0 suspendiert und PEG-CDI (2facher molarer Überschuss, bezogen auf Gesamt-Hämoglobinlysine) wurde hinzugefügt, und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für die Dauer von 6 Stunden gerührt. Die entstandenen PEG-IHC wurden dann durch Filtration getrennt, in Salzlösung gewaschen und in steriler gepufferter Salzlösung resuspendiert.

Beispiel 21

Parameter, die die Bildung von unlöslichen Hämoglobin-Konstrukten beeinflussen

[0165] Etliche Variable, wie Proteinkonzentration, Temperatur, Beschallungszeit, akustische Stärke, pH-Wert, wurden untersucht, um die Bildung der IHC zu optimieren.

[0166] Diese Materialien wurden aus 1%-, 2,5%-, 5%- und 10%-Hämoglobin-Lösungen hergestellt.

[0167] Sie wurden ebenfalls aus gemischter Protein-Lösung hergestellt, wie Hämoglobin und Humanserumalbumin, mit Konzentrationen, die wiederum zwischen 1 bis 10% lagen. Die Größe und Konzentrationen wurden mittels eines Partikelzählgeräts bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Größe nicht signifikant mit der Anfangs-Proteinkonzentration variierte. Die zubereitete Anzahl stieg mit steigender Anfangs-Proteinkonzentration bis zu ungefähr 5%. Keine signifikante Veränderung der Anzahl wurde oberhalb dieser Konzentration beobachtet.

[0168] Die anfängliche Gefäßtemperatur wurde als wichtig für die optimale Herstellung der IHC festgestellt. Typischerweise wurden die anfänglichen Reaktionstemperaturen zwischen 0 und 80°C gehalten. Die optimale Starttemperatur war grob 70°C.

[0169] Die Beschallungsdauer war ebenfalls ein wichtiger Faktor bei der Bestimmung der Anzahl der je Milliliter hergestellten IHC. Es wurde festgestellt, dass eine Beschallungsdauer von grob 30 Sekunden gut war, um eine hohe Konzentration der IHC zu synthetisieren. Längere oder kürzere Beschallungszeiten ergaben weniger, aber immer noch eine angemessene Anzahl an IHC.

[0170] Entsprechend dem Nomogramm, bereitgestellt vom Hersteller des Beschallungsgerätes, ist die Nennschallleistung des Beschallungsgerätes, das bei diesen Experimenten verwendet wurde, ungefähr 150 Watt/cm^2. Bei anderen Leistungseinstellungen wurde ebenfalls festgestellt, dass eine große Anzahl an IHC hergestellt wurde.

Beispiel 22

Unlösliche Hämoglobin-Konstrukte als Arzneimittelträger von öllöslichen Arzneimitteln

[0171] Die zytotoxischen Wirkungen etlicher antineoplastischer Arzneimittel sind bei Vorhandensein von Sauerstoff stark verbessert. Es ist daher erstrebenswert, ein Arzneimittel einer Tumorstelle zuzuführen, während die Sauerstoff-Konzentration in diesem Bereich erhöht wird. Die Hämoglobin-Mikrokugeln der vorliegenden Erfindung sorgen für diese Fähigkeit. Das obige Beispiel 16 beschreibt die Einkapselung einer Fluorkohlenstoff-Flüssigkeit in eine Hülle aus unlöslichem Hämoglobin. Zytotoxische Arzneimittel, wie Cyclophosphamid, BCNU, Melphalan, Taxol, Camptothecin, Adriamycin, Etoposid und dergleichen, können im Fluorkohlenstoff oder einem anderen geeigneten Öl, wie Sojaöl, gelöst und in das Hämoglobin-Konstrukt eingekapselt werden.

[0172] Taxol wurde in Sojabohnenöl (SBO) auf eine Konzentration von 5 mg/ml gelöst. 3,5 ml einer 5%igen Hämoglobin-Lösung wurden in ein Reagenzgefäß gegeben, und 3,5 ml des SBO/Taxol wurde zu dem Gefäß hinzugefügt. Die Zwei-Phasen-Mischung wurde beschallt, wie in Beispiel 16 beschrieben, um vernetzte unlösliche Hämoglobinhüllen, die SBO/Taxol enthielten, zu gewinnen.

Beispiel 23

Polymerhüllen als Arzneimittelträger von wasserlöslichen Arzneimitteln

[0173] Etliche wasserlösliche Arzneimittel sind Kandidaten zur Einkapselung in Polymerhüllen. Als ein Beispiel wurde Methotrexat in Wasser auf eine Konzentration von 5 mg/ml gelöst. Ein Milliliter dieser wässrigen Lösung wurde mit 4 ml Sojaöl emulgiert unter Verwendung von Pluronic-65 (Block-Copolymer aus Polyethylenoxid und Polypropylenoxid), um eine stabile Wasser-in-Öl-(W/O-)Mikro-Emulsion zu bilden. 3,5 ml einer 5%igen Hämoglobin-Lösung wurden mit 3,5 ml dieser W/O-Mikro-Emulsion überschichtet und für die Dauer von 30 Sekunden beschallt, um unlösliche Hämoglobin-Konstrukte zu erhalten, die eine eingekapselte Mikro-Emulsion mit Methotrexat enthalten.

Beispiel 24

Polymerhüllen als Proteinträger

[0174] Etliche Proteine sind Kandidaten zur Einkapselung in Polymerhüllen, z. B. Hämoglobin, Albumin und dergleichen. Zum Beispiel könnte als ein Verfahren zur Erhöhung des Hämoglobingehalts der IHC das Hämoglobin in das IHC eingekapselt werden, anstatt des wasserlöslichen Arzneimittels in Beispiel 23. Hämoglobin wurde auf eine Konzentration von 10% in Wasser gelöst. Ein Milliliter dieser wässrigen Lösung wurde mit 4 ml Sojaöl emulgiert unter Verwendung von Pluronic-65 (Block-Copolymer aus Polyethylenoxid und Polypropylenoxid), um eine stabile Wasser-in-Öl-(W/O-)Mikro-Emulsion zu bilden. 3,5 ml einer 5%igen Hämoglobin-Lösung wurden mit 3,5 ml dieser W/O-Mikro-Emulsion überschichtet, die Hämoglobin enthielt. Die Zweiphasen-Mischung wurde für die Dauer von 30 Sekunden beschallt, um unlösliche Hämoglobin-Konstrukte zu erhalten, die eine eingekapselte Mikro-Emulsion enthielten, welche ebenfalls Hämoglobin enthielt. Dieses Verfahren diente dazu, die Gesamtmenge an Hämoglobin je Mikrokugel des IHC zu erhöhen und erhöhte darum die Sauerstofftransportfähigkeit für gebundenen Sauerstoff.

Beispiel 25

In-vivo-Verabreichung von Konstrukten, die Arzneimittel befördern

[0175] Unlösliche Hämoglobin-Konstrukte, die eingekapseltes Taxol (in SBO) enthalten, wurden gemäß Beispiel 22 hergestellt. Die Endsuspension wurde bereitet, um 20 Volumen-% SBO in steriler Salzlösung zu enthalten. 2 ml dieser Suspension wurden über die Schwanzvene einer mit Ketamin betäubten Sprague-Dawley-Ratte injiziert.

[0176] Die Ratte wurde 2 Stunden nach der Injektion geopfert und die Leber entnommen. Die Leber wurde mit einer kleinen Menge Salzlösung homogenisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde lyophilisiert, in Methanol gelöst und in eine HPLC-Säule injiziert. Ungefähr 15% der Anfangsdosis an unmetabolisiertem Taxol wurden aus der Leber zurückgewonnen. Dies bestimmte die Durchführbarkeit des Targetings von antineoplastischen Arzneimitteln auf die Leber in Verbindung mit der Zufuhr von Sauerstoff an diese Stellen.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung zur In-vivo-Verabreichung einer biologischen Substanz durch intravenöse oder intraarterielle Injektion, wobei die biologische Substanz ausgewählt ist aus:
– einem Feststoff, dispergiert in einem nichtwässrigen biokompatiblen Dispergierungsmittel, das im Wesentlichen vollständig in einer polymeren Hülle enthalten ist,
– einer Flüssigkeit, dispergiert in einem nichtwässrigen biokompatiblen Dispergierungsmittel, das im Wesentlichen vollständig in einer polymeren Hülle enthalten ist, oder
– Kombinationen der beiden,
– wobei die größte Querschnittsabmessung der Hülle nicht größer als 10 µm ist,
– wobei die polymere Hülle ein biokompatibles Material umfasst, das im Wesentlichen durch Disulfidbindungen vernetzt ist,
– wobei die polymere Hülle wahlweise durch ein geeignetes Mittel modifiziert ist, wobei das Mittel wahlweise mit der polymeren Hülle durch eine optionale kovalente Bindung verbunden ist, und
– wobei die biologische Substanz ein pharmazeutisch aktives Mittel ist, ausgewählt aus analgetischen Mitteln, Betäubungsmitteln, Antiasthmatika, Antibiotika, Antidepressiva, Antidiabetika, Antimykotika, Blutdruck senkenden Mitteln, entzündungshemmenden Mitteln, antineoplastischen Mitteln, anxiolytischen Mitteln, enzymatisch aktiven Mitteln, Nukleinsäurekonstrukten, immunstimulierenden Mitteln, immunsuppressiven Mitteln oder Vakzinen.

2. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei die antineoplastischen Mittel Paclitaxel, Paclitaxel-Analoga, Taxane oder Taxotere sind.

3. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei das pharmazeutisch aktive Mittel ein Nukleinsäurekonstrukt ist.

4. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei das biokompatible Dispergierungsmittel ausgewählt ist aus Sojaöl, Kokosöl, Olivenöl, Safloröl, Baumwollsamenöl, aliphatischen, zykloaliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffen mit 4–30 Kohlenstoffatomen, aliphatischen oder aromatischen Alkoholen mit 2–30

Kohlenstoffatomen, aliphatischen oder aromatischen Estern mit 2–30 Kohlenstoffatomen, Alkyl, Aryl oder zyklischen Ethern mit 2–30 Kohlenstoffatomen, Alkyl- oder Arylhalogeniden mit 1–30 Kohlenstoffatomen, wahlweise mit mehr als einem Halogen-Substituenten, Ketonen mit 3–30 Kohlenstoffatomen, Polyalkylenglykol oder Kombinationen von beliebigen zwei oder mehr davon.

5. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei das vernetzte Polymer ein natürlich vorkommendes Polymer, ein synthetisches Polymer oder eine Kombination davon ist, wobei das Polymer vor der Vernetzung kovalent daran gebundene Sulfhydrylgruppen oder Disulfid-Verbindungen aufweist.

6. Zusammensetzung gemäß Anspruch 5, wobei das natürlich vorkommende Polymer ausgewählt ist aus Proteinen, die Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen enthalten, aus Polypeptiden, die Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen enthalten, aus Lipiden, die Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen enthalten, aus Polynukleinsäuren, die Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen enthalten, oder aus Polysacchariden, die Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen enthalten.

7. Zusammensetzung gemäß Anspruch 6, wobei das Protein aus Hämoglobin, Albumin, Insulin, Lysozym, Immunglobulinen, α-2-Makroglobulin, Fibronektin, Vitronektin, Fibrinogen oder Kombinationen von beliebigen zwei oder mehr davon ausgewählt ist.

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

9. Zusammensetzung gemäß Anspruch 7, wobei das Protein Hämoglobin ist.

10. Zusammensetzung gemäß Anspruch 7, wobei das Protein eine Kombination aus Albumin und Hämoglobin ist.

11. Zusammensetzung gemäß Anspruch 6, wobei die Polysaccharide ausgewählt sind aus Alginat, Alginaten mit hohem M-Anteil, Polymannuronsäure, Polymannuronaten, Hyaluronsäure, Hyaluronat, Heparin, Dextran, Chitosan, Chitin, Cellulose, Stärke, Glykogen, Guarmehl, Johannisbrotgummi, Dextran, Levan, Inulin, Cyklodextran, Agarose, Xanthanlösung, Karageenen, Heparin, Pektin, Gellangummi, Skleroglukan oder Kombinationen von beliebigen zwei oder mehr davon.

12. Zusammensetzung gemäß Anspruch 5, wobei das synthetische Polymer ausgewählt ist aus synthetischen Polyaminosäuren, die Cystein-Reste und/oder Disulfidgruppen enthalten, aus synthetischen Polypeptiden, die Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen enthalten, aus Polyvinylalkohol, der modifiziert wurde, um freie Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen zu enthalten, aus Polyhydroxyethylmethacrylat, das modifiziert wurde, um freie Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen zu enthalten, aus Polyacrylsäure, die modifiziert wurde, um freie Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen zu enthalten, aus Polyethyloxazolin, das modifiziert wurde, um freie Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen zu enthalten, aus Polyacrylamid, das modifiziert wurde, um freie Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen zu enthalten, aus Polyvinylpyrrolidinon, das modifiziert wurde, um freie Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen zu enthalten, aus Polyalkylenglykolen, die modifiziert wurden, um freie Sulfhydrylgruppen und/oder Disulfidgruppen zu enthalten, wie auch aus Mischungen von beliebigen zwei oder mehr davon.

13. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei die Disulfidbindungen in dem vernetzten Polymer durch Ultraschallbeschallung gebildet sind.

14. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei die Polymerhülle, die eine biologische Substanz enthält, in einem biokompatiblen Medium suspendiert ist, und wobei das biokompatible Medium ausgewählt ist aus Wasser, gepufferten wässrigen Medien, Salzlösung, gepufferter Salzlösung, Lösungen aus Aminosäuren, Proteinlösungen, Zuckerlösungen, Vitaminlösungen, Kohlenhydratlösungen, Lösungen aus synthetischen Polymeren, lipidhaltigen Emulsionen oder Kombinationen von beliebigen zwei oder mehr davon.

15. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei die Polymerhülle durch ein geeignetes Mittel modifiziert ist, wobei das geeignete Mittel ausgewählt ist aus einem synthetischen Polymer, Phospholipid, einem Protein, einem Polysaccharid, einem oberflächenwirksamen Mittel, einem chemischen Modifikationsmittel oder einer Kombination daraus, wobei das Mittel mit der Polymerhülle durch eine optionale kovalente Verbindung verbunden ist.

16. Verfahren zur Zubereitung einer biologischen Substanz zur In-vivo-Verabreichung durch intravenöse

oder intraarterielle Injektion, wobei das Verfahren umfasst, dass ein wässriges Medium, das biokompatibles Material, das durch Disulfidbindungen vernetzt werden kann, und eine biologische Substanz gemäß Anspruch 1 enthält, Ultraschall-Bedingungen hoher Intensität für eine Zeit ausgesetzt wird, die ausreicht, das biokompatible Material durch im Wesentlichen Disulfidbindungen zu vernetzen;
– wobei die biologische Substanz im Wesentlichen vollständig in einer polymeren Hülle enthalten ist,
– wobei die größte Querschnittsabmessung der Hülle nicht größer als 10 μm ist, und
– wobei die biologische Substanz ein Feststoff oder eine Flüssigkeit ist, die in einem nichtwässrigen biokompatiblen Dispergierungsmittel dispergiert sind.

17. Verwendung einer Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung der biologischen Substanz an einen Patienten, wobei das Medikament eine wirksame Menge der Zusammensetzung enthält.

18. Verwendung einer Zusammensetzung gemäß Anspruch 15 zur Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung der biologischen Substanz an einen Patienten, wobei das Medikament eine wirksame Menge der Zusammensetzung enthält.

19. Zusammensetzung zur In-vivo-Verabreichung von Paclitaxel, wobei ein wasserunlösliches Paclitaxel in einer biokompatiblen Flüssigkeit suspendiert ist, und wobei die entstehende Suspension Partikel von Paclitaxel enthält, die eine Querschnittsabmessung von nicht größer als 10 μm aufweisen, wobei das Paclitaxel im Wesentlichen vollständig in einer polymeren Hülle enthalten ist und wobei die polymere Hülle ein biokompatibles Material umfasst, das im Wesentlichen durch Disulfidbindungen vernetzt ist.

20. Zusammensetzung gemäß Anspruch 19, wobei Paclitaxel und geeignetes Medium Ultraschallbeschallung für eine Zeit ausgesetzt wird, die ausreicht, Partikel mit einer maximalen Querschnittsabmessung von nicht größer als 10 μm herzustellen.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

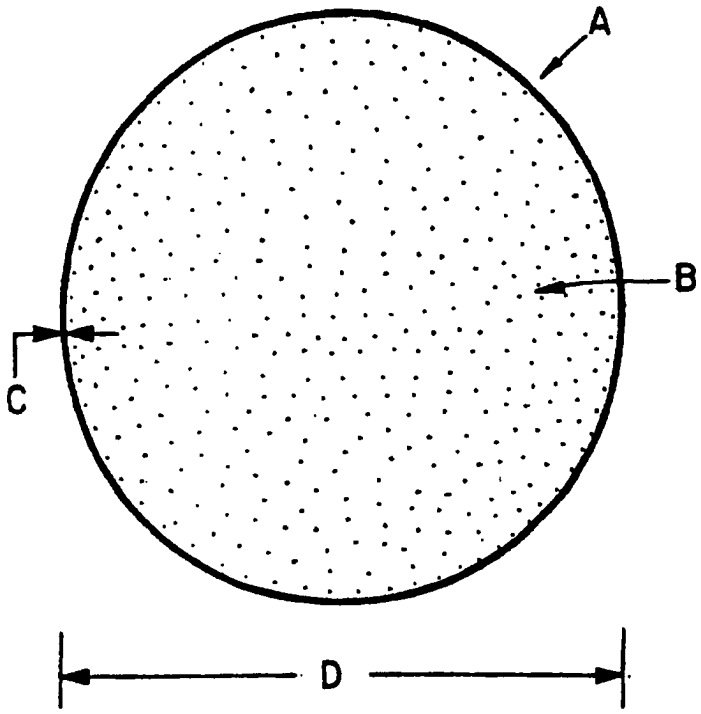

FIG.1