



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 36 904 T2** 2007.11.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 833 614 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 36 904.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/10031**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 918 456.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/040069**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.06.1996**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **19.12.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.04.1998**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **14.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.11.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**480624 07.06.1995 US**

(73) Patentinhaber:

**SRI International, Menlo Park, Calif., US**

(74) Vertreter:

**Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183  
Wiesbaden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**BOMBERGER, C., David, Belmont, CA 94002, US;  
CATZ, G., Paul, Palo Alto, CA 94306, US;  
SMEDLEY, I., Mark, CH-1620 Nyon, CH; STEARNS,  
C., Paul, Redwood City, CA 94061, US**

(54) Bezeichnung: **SYSTEM UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG ARZNEISTOFFBELADENER MIKROPARTIKEL**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Fachgebiet

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen das Gebiet der Herstellung von arzneistoffbeladenen Mikropartikeln und im Besonderen das Gebiet der Herstellung von Mikropartikeln, die zu einer verlängerten kontrollierten Freisetzung des Arzneistoffes über einen Zeitraum führen. Spezieller betrifft die vorliegende Erfindung ein System und ein Verfahren zum Beladen von Mikropartikeln mit dem interzellularen Adhäsionsmolekül ICAM-1, einer oder mehreren funktionellen Domänen von ICAM-1, einem oder mehreren biologisch aktiven ICAM-1 Fragmenten, Analogen von solchen biologisch aktiven ICAM-1-Fragmenten und mit Kombinationen und funktionellen Derivaten davon, wobei diese Mikropartikel in der Nasenhöhle abgelagert werden und über mehrere Stunden hinweg zu einer verlängerten kontrollierten Freisetzung von ICAM-1 führen.

## Hintergrund der Erfindung

**[0002]** In den letzten Jahren hat der Nasendurchgang als ein alternativer Weg der Verabreichung für systemisch aktive Arzneistoffe, wie Peptide und Proteine, an Aufmerksamkeit gewonnen. Einige Proteine, wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1, werden über den Nasendurchgang am besten abgegeben.

**[0003]** Der gewünschte Größenbereich von Mikropartikeln, der verwendet werden kann, um Arzneistoffe über den Nasendurchgang abzugeben, ist recht eng, d. h. aerodynamische Durchmesser von etwa 20 µm bis 80 µm. Wenn die Mikropartikel zu klein sind, d. h. kleiner als etwa 10 µm, können sie mit dem Luftstrom nach unten in den tracheobronchialen Bereich transportiert werden. Somit könnten Mikropartikel mit einem Durchmesser von weniger als etwa 10 µm verwendet werden, um Arzneistoffe über die tracheobronchialen Wege abzugeben. Wenn die Mikropartikel zu groß sind, d. h. größer als etwa 100 µm, werden die Mikropartikel relativ schnell aus dem Nasendurchgang ausgeschieden.

**[0004]** Die Arzneistoffabgabe an die Nasenschleimhaut, entweder zur topischen oder systemischen Wirkung, wird durch die Dauer des Kontakts mit den arzneistoffbeladenen Partikeln beeinflusst. Nasenspray-Präparate, die unter Verwendung von Pumpen oder unter Druck stehenden Dosier-Inhalatoren verabreicht werden, lagern sich hauptsächlich im vorderen Teil der Nasenhöhle ab. Dieser Bereich ist weitgehend nicht-bewimpert, und die Clearance ist relativ langsam. Im Allgemeinen scheidet die mukoziliäre Funktion Materialien aus der Nasenmuschel in den Nasopharynx aus, im Durchschnitt mit einer Geschwindigkeit von etwa 6 mm/min, wobei die Fließgeschwindigkeit später ansteigt. Die nasale Clearance hängt von der Partikelgröße der arzneistoffbeladenen Partikel und dem Ablagerungsort innerhalb des Nasendurchgangs ab. Partikel, die in dem spärlich oder nicht-bewimperten vorderen Bereich der Nasenhöhle abgelagert werden, werden aufgrund eines langsamen Zuges vom angrenzenden Mukus mit langsamerer Geschwindigkeit ausgeschieden.

**[0005]** Die Mehrheit der menschlichen Rhinoviren, der Hauptauslöser der gewöhnlichen Erkältung, verwendet das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) als einen Rezeptor an Wirtszellen. ICAM-1 ist ein integrales Membranprotein mit einem großen N-terminalen extrazellulären Teil, einem transmembranen Anker und einer kurzen C-terminalen cytoplasmatischen Domäne. Die normale physiologische Funktion von ICAM-1 besteht darin, als ein Membran-gebundener Ligand des Leukozytenintegrin-Lymphozytenfunktions-assoziierten Antigens 1 (LFA-1) zu dienen und die interzelluläre Adhäsion zwischen Leukozyten und einer Vielzahl von Zelltypen zu vermitteln. (Siehe Greve et al., "Mechanisms of Receptor-Mediated Rhinovirus Neutralization Defined by Two Soluble Forms of ICAM-1", J. Virol. 65(11): 6015–6023 (1991)). Da ICAM-1 das menschliche Rhinovirus bindet, wurde eine gekürzte Form von ICAM-1, t-ICAM-453, zur klinischen Anwendung als ein nasal abgegebenes Prophylaktikum für Rhinovirus-Infektionen vorgeschlagen. Es wäre wünschenswert, die notwendige wiederholte Verabreichung zu minimieren, indem eine erhöhte ICAM-1-Verweildauer in der Nasenhöhle bereitgestellt wird.

**[0006]** Die Technologie der Mikropartikel-Herstellung weist bei der Arzneistoffabgabe umfangreiche Anwendungsmöglichkeiten auf. Eine Anzahl von Verfahren wird bereits eingesetzt, um solche Mikropartikel herzustellen, einschließlich Lösemittelverdunstung und Sprühtrocknen. Eines der einfachsten derzeit verfügbaren Verfahren ist die Herstellung von Kalziumalginat-Mikropartikeln, indem Natriumalginat-Lösung als Tröpfchen in eine Kalziumchlorid-Lösung extrudiert oder gesprüht wird.

**[0007]** Die Eignung von Mikropartikeln zur kontrollierten Freisetzung von Arzneistoffen, einschließlich Proteinen, über den Nasendurchgang erfordert ein Produkt von kleinem Durchmesser, d. h. wesentlich weniger als 1 Millimeter, das in einer reproduzierbaren Größe und Arzneistoffverteilung hergestellt werden kann, und das

kontrollierte Abbaueigenschaften aufweist.

**[0008]** Ein Verfahren zur Herstellung von Kalziumalginat-Mikropartikeln ist die Dispersion der wässrigen Natriumalginat-Lösung, die Arzneistoff in einer organischen Phase enthält, und anschließende Zugabe von Kalziumchlorid, um die Emulsions-gebildeten Tröpfchen zu härten. Bei einem solchen diskontinuierlichen Verfahren sind ein Verhältnis von 3:2 zweier oberflächenaktiver Mittel (Sorbitantrioleat und Polyoxyethylensorbitantrioleat) und eine möglichst geringe Konzentration von etwa 1% Gewicht/Gewicht (Gew./Gew.) an oberflächenaktivem Mittel zur Zugabe zu dem Gemisch erforderlich, um verträgliche arzneistoffbeladene Partikel herzustellen. (Siehe z.B. Wan et al., "Drug Encapsulation in Alginate Microspheres by Emulsification." Microencapsulation 9(3): 309–316 (1992)). Weitere Verhältnisse oder Konzentrationen oberflächenaktiver Gemische können Mikropartikel-Größe, -Form, -Verklumpungsgrad, -Arzneistoffbeladung und -Arzneistoff-Freisetzungseigenschaften beeinflussen. Somit ist dieses Verfahren zur Herstellung von Kalziumalginat-Mikropartikeln gegenüber den Typen und Konzentrationen oberflächenaktiver Mittel empfindlich.

**[0009]** Bei dem diskontinuierlichen Emulsionsbildungs- und Härungsverfahren sind im Allgemeinen oberflächenaktive Mittel erforderlich, um die Mikropartikelgröße/-form und die Effizienz der Arzneistoffverkapselung zu verbessern. Die Probleme, die wahrscheinlich als Ergebnis der Verwendung solcher oberflächenaktiver Mittel auftreten, umfassen: Schwierigkeit beim Auswaschen der oberflächenaktiven Mittel aus der Zubereitung und beim Messen der rückständigen Spiegel; mögliche gesundheitliche Nebenwirkungen, die durch rückständige oberflächenaktive Mittel verursacht werden; Schwierigkeit beim Auswaschen der oberflächenaktiven Mittel aus der Zubereitung ohne den Arzneistoff auszuwaschen; und potentielle Wirkungen auf Bioadhäsion, Quellverhalten und Arzneistoff-Freisetzungsprofil des Mikropartikels.

**[0010]** Sprühtröpfchen-Bildungsverfahren zur Herstellung von Mikropartikeln neigen dazu, große Partikel, d. h. mehr als 1 Millimeter (1 mm) Durchmesser, zu produzieren. Obwohl Sprühtröpfchen-Bildungsverfahren zur Herstellung von Mikropartikeln in dem gewünschten Größenbereich von etwa 20 µm bis 80 µm verwendet werden könnten, ist dieses Tröpfchen-Bildungsverfahren aufgrund der Schwierigkeit bei der Skalierung des Verfahrens, auf Grund von Prozessvariabilität und mangelnder Eignung zur sauberen pharmazeutischen Verarbeitung nicht wünschenswert.

**[0011]** Zahlreiche Chemikalien, Polymere und Mittel zur kontrollierten Freisetzung, die bei der Herstellung von Mikrokügelchen verwendet werden können, sind bekannt und im Handel erhältlich. Beispiele von Materialien, die zur Herstellung von Mikrokügelchen zur Abgabe über die Nase verwendet werden, sind: cellulosische Polymere, insbesondere Niederalkylether von Cellulose, Stärke, Gelatine, Collagen, Dextran und Dextran-Derivate, Proteinpolymere, wie Albumin, Dinatriumcromoglycat, Sephadex oder DEAE-Sephadex. Diese können Gemische oder Überzüge mit anderen Materialien, wie Polyacrylsäuren, zur Verbesserung der bioadhäsiven Eigenschaften oder der kontrollierten Freisetzungseigenschaften der Mikrokügelchen umfassen. (Siehe z.B. U.S.-Patent Nr. 5,204,108 für Illum.)

**[0012]** Weitere Materialien, die bei der Herstellung von Mikropartikeln verwendet werden können, sind bekannt und umfassen unter anderem Alginate, Xanthanlösung und Gellangummi. Alle drei Substanzen sind als magensaftresistente Überzüge wirksam. Alginate sind bekannt dafür, gleichmäßige Filme zu erzeugen, mit Anwendung in so verschiedenen Industrien, wie Papier-Coatings, Textildruck und Nahrungsmittel. Der Alginatfilm ist als ein magensaftresistenter Überzug besonders geeignet, da er normalerweise als lösliche Natriumform angewendet wird, die sodann durch die Magensäfte in die unlösliche Alginsäureform übergeführt wird. Es wurden bereits Verbesserungen vorgenommen, indem Natriumalginat mit Natriumkalziumalginat in Tabletten, die eine hohe Arzneistoffbeladung enthalten, kombiniert wurde.

**[0013]** Alginate werden seit vielen Jahren aufgrund ihrer Fähigkeit, bei Kontakt mit den Magensäften ein Gel zu bilden, auch in Fluidsuspensionen eingesetzt. Außerdem werden Kalziumalginatgelperlen dazu verwendet, eine Vielzahl von Substanzen aufzunehmen, wie Geschmacksstoffe in der Nahrungsmittelindustrie, Enzyme für Bioreaktoren, lebende Zellen und lebende Organismen. Kalziumalginat wird aufgrund der bei seiner Herstellung eingesetzten milden Bedingungen und der Ungiftigkeit der Reagenzien besonders favorisiert.

**[0014]** Alginat ist ein Sammelbegriff für eine Familie von Copolymeren, die 1,4-verknüpfte β-D-Mannuronsäure- und α-L-Guluronsäure-Resten in variierenden Anteilen und in aufeinander folgender Anordnung enthalten. Alginat bildet mit zweiwertigen Ionen, wie Kalzium, Gele, und die gelbildenden Eigenschaften korrelieren stark mit Anteil und Länge der Blöcke angrenzender L-Guluronsäure-Reste in den Polymerketten. Die Eigenschaften von Alginaten sind in Martinsen et al., "Alginate as Immobilization Material", Biotechnol. Bioeng. 33: 79–89 (1989) beschrieben.

**[0015]** Obwohl mehrere Berichte über die Verwendung von Alginatperlen zur Mikroverkapselung von Peptiden und Proteinen vorliegen, geben fast alle Berichte Perlengrößen über 100 µm im Durchmesser an. Außerdem stellen nahezu alle Berichte Alginat-Gelperlen durch Zutropfen von Natriumalginat-Lösung zu einer wässrigen Kalziumchlorid-Lösung unter Bildung der Perlen her. Obgleich ein solches Verfahren durchaus mikroverkapselte Perlen hervorbringt, machen die schwer zu kontrollierenden Betriebsbedingungen, um Mikropartikel in dem gewünschten Größenbereich herzustellen, die Schwierigkeit der Skalierung und die mangelnde Eignung zur sauberen pharmazeutischen Verarbeitung solche Verfahren zur kommerziellen Herstellung von Mikropartikeln, die Proteine, wie ICAM-1, enthalten, impraktikabel.

**[0016]** Die Herstellung von arzneistoffbeladenen Mikrokügelchen ist in der U.S.-Patentschrift Nr. 5,204,108 von Illum allgemein beschrieben. Nach dieser Patentschrift werden Wirkstoffe in aus Gelatine, Albumin, Collagen, Dextran und Dextran-Derivaten hergestellte Mikrokügelchen eingearbeitet. Die fertigen Mikrokügelchen werden vernetzt und schließlich zur transmukosalen Abgabe verarbeitet. Nach wie vor besteht allerdings ein Bedarf an Mikrokügelchen, die einen Arzneistoff an den Nasendurchgang zur kontrollierten Langzeitfreisetzung des Arzneistoffes in dem Durchgang abgeben und die weder die Schleimhautbarriere überschreiten noch aus dem Durchgang ausgeschieden werden.

**[0017]** Somit besteht nach wie vor Bedarf an einem Verfahren und einem System zur Herstellung von Mikropartikeln, die mit Arzneistoffen, Peptiden oder Proteinen beladen sind, die zur kontrollierten, verlängerten Freisetzung des Arzneistoffes oder Proteins verwendet werden können. Das bevorzugte Verfahren und System sollte zuverlässig Mikropartikel zur Arzneistoffabgabe in den Nasendurchgang herstellen, die eine vorhersagbare Beladung aufweisen, die innerhalb eines Größenbereichs von etwa 20 µm bis etwa 80 µm liegen, mit etwa 80% bis etwa 100% Ausbeute und ohne nennenswerten Verlust in der Arzneistoffwirksamkeit.

**[0018]** WO 96 03142A beschreibt eine Zusammensetzung zur Arzneistoffabgabe zur nasalen Verabreichung von antiviralen Mitteln. WO 93 06842A beschreibt die Verwendung interzellulärer Adhäsionsmoleküle und ihrer Bindungsliganden bei der Behandlung von Asthma. WO 91 06282A beschreibt Arzneistoffzusammensetzungen mit kleinen Partikeln. US 5476663 beschreibt Mikrokapseln, die durch Herstellen einer Wasser-in-Öl-Emulsion hergestellt werden.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0019]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein System und ein Verfahren zur Herstellung von Alginatmikropartikeln, die mit einem Arzneistoff, einschließlich einem Protein, wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1, das über den Nasendurchgang abgegeben werden kann, beladen sind.

**[0020]** Nach einem Aspekt der Erfindung wird eine Vorrichtung zum Bilden von arzneistoffbeladenen Mikropartikeln bereitgestellt, mit: einer ersten Mischkammer, die aufweist: einen ersten Anschluss, der geeignet ist, um eine erste Strömung einer ersten Lösung axial in die erste Mischkammer einzuführen, wobei die Strömung vorbestimmte Mengen des Arzneistoffes und ein Mikropartikel-bildendes Polymer aufweist; und einen zweiten Anschluss neben dem ersten Anschluss, der geeignet ist, eine zweite Strömung eines Emulgators in die erste Strömung einzuführen, um eine Emulsion in der ersten Mischkammer zu bilden, wobei der zweite Anschluss einen Durchmesser und eine Ausrichtung zu der ersten Mischkammer hat, die zweite Strömung geführt ist, um die erste Lösung in kleine Partikel aufzubrechen, und der zweite Anschluss die zweite Strömung und die erste Strömung beeinflusst, um kleine Partikel zu bilden und in einer schraubenförmigen Bahn in der ersten Mischkammer zu bewegen; und einer zweiten Mischkammer, die axial neben der ersten Mischkammer angeordnet ist, mit einem dritten Anschluss, der geeignet ist, eine Vernetzungslösung einzuführen, die eine vorbestimmte Menge an Vernetzungsmittel in einem Vernetzungslösungsmittel enthält, und zwar in die zweite Mischkammer hinein, wobei der dritte Anschluss einen Durchmesser und eine Ausrichtung zu der zweiten Mischkammer hat, wobei das Vernetzungsmittel orthogonal zu einer Achse der zweiten Mischkammer und versetzt zu dieser eingespeist wird und das Vernetzungsmittel durch den dritten Anschluss in die erste Strömung und die zweite Strömung unter Erzeugung eines turbulenten, schraubenförmigen Flusses geführt wird.

**[0021]** Nach einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung arzneistoffbeladener Mikropartikel mit den folgenden Schritten bereitgestellt: Einführen einer Strömung mit einem Alginat und des Arzneistoffes mit einer vorbestimmten Fließgeschwindigkeit in eine erste Mischkammer, um Alginattröpfchen, die den Arzneistoff enthalten, zu bilden; Einführen einer Strömung eines Emulgators mit einer vorbestimmten Fließgeschwindigkeit in die erste Mischkammer; Bilden einer Emulsion der Alginattröpfchen und des Emulgators in der ersten Mischkammer; und Transportieren der Emulsion aus der ersten Mischkammer und in einen Behälter, der eine Menge eines Vernetzungsmittels enthält.

**[0022]** Es wird ein System beschrieben, das ein halbkontinuierliches Durchflusssystem aufweist, das eine arzneistoffbeladene Alginat-Strömung, besonders bevorzugt ein niederviskoses Natriumalginat (LVCR), mit einer Emulgator-Strömung mischt, um eine Emulsion in einer Mischkammer zu bilden. An einem Punkt stromabwärts, entweder in derselben oder einer daran anschließenden Mischkammer, wird der Emulsion eine Strömung, die ein Vernetzungsmittel, wie ein Kalziumsalz, enthält, zugesetzt. Bei dem Vernetzungsprozess wird Natrium in dem Natriumalginat durch Kalzium ersetzt, wobei nicht wasserlösliche arzneistoffbeladene Kalziumalginat-Mikropartikel gebildet werden. Nach dem Sammeln werden die Mikropartikel filtriert, gewaschen, in einem Vakuumofen getrocknet und, wenn nötig, unter Verwendung von mäßigem Druck desaggregiert, um einzelne arzneistoffbeladene Mikropartikel herzustellen, die über den Nasendurchgang abgegeben werden können.

**[0023]** Das System und das Verfahren einer Ausführungsform erzeugen Mikropartikel mit aerodynamischen Durchmessern von etwa 20 µm bis etwa 80 µm, wobei der aerodynamische mittlere Massendurchmesser (AMMD) bevorzugt etwa 40 µm bis etwa 50 µm beträgt, mit einer ICAM-1-Beladung von etwa 10 Gew.-%. Die Systemausbeute beträgt bis zu etwa 100%.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0024]** [Fig. 1](#) zeigt eine schematische Darstellung im Längsquerschnitt einer Darstellung des erfindungsgemäßen Mischblocks.

**[0025]** [Fig. 2](#) zeigt ein Schema eines erfindungsgemäßen Verfahrens und Systems.

**[0026]** [Fig. 3](#) ist ein Fließdiagramm einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens.

**[0027]** [Fig. 4](#) zeigt eine schematische Darstellung im Längsquerschnitt eines erfindungsgemäßen repräsentativen Mischblocks.

**[0028]** [Fig. 4A](#) zeigt den Mischblock von [Fig. 4](#) im Längsquerschnitt, mit Schlauch- und Mylar-Anschlüssen.

**[0029]** [Fig. 4B](#) ist ein Querschnitt entlang der Linien 4B-4B von [Fig. 4A](#).

**[0030]** [Fig. 4C](#) ist ein Querschnitt entlang der Linien 4C-4C von [Fig. 4A](#).

**[0031]** [Fig. 5](#) zeigt einen repräsentativen zweiten Mischblock im Längsquerschnitt mit der zweiten Mischkammer eines erfindungsgemäßen Systems.

**[0032]** [Fig. 6](#) zeigt einen repräsentativen zweiten Mischblock im Längsquerschnitt mit der zweiten Mischkammer eines erfindungsgemäßen Systems.

#### BESCHREIBUNG DER SPEZIELLEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0033]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues System und ein neues Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln, die mit einem gewünschten Arzneistoff oder Protein, wie ICAM-1, beladen sind, die über den Nasendurchgang abgegeben werden können, zur kontrollierten Freisetzung des Arzneistoffes.

**[0034]** Die meisten Arzneistoffabgabesysteme unter Verwendung des Nasendurchgangs sind bestrebt, den systemischen Transfer des Arzneistoffes zu erhöhen. Der Mechanismus des Proteins, interzelluläres Adhäsionsmolekül ICAM-1, erfordert, dass das Partikel auf der Oberfläche des Nasendurchgangs verbleibt, wobei es weder in das Wirtssystem absorbiert noch durch das wirksame nasale Clearancesystem ausgeschieden wird. Für ICAM-1 ist es somit wichtig, ein System zur Herstellung ICAM-1-beladener Mikropartikel zu benennen, die an einen Nasendurchgang abgegeben werden können und die für eine gewisse Zeit in dem Durchgang verbleiben, damit die Bindung des ICAM-1-Moleküls an das Ziel-Rhinovirus-Molekül ermöglicht wird, bevor das ICAM-1 absorbiert oder anderweitig ausgeschieden wird.

**[0035]** Das hier beschriebene System produziert zuverlässig kugelige Mikropartikel mit aerodynamischen Durchmessern im Bereich von etwa 20 µm bis etwa 80 µm, bevorzugt mit einem AMMD in dem Bereich von etwa 40 µm bis etwa 50 µm, und mit einer ungefähren Arzneistoffbeladung von 10 Gew.-% und einer ICAM-1-Gewinnungsrate von größer als etwa 80%.

**[0036]** Bezug nehmend auf [Fig. 4](#) der Zeichnungen weist eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Systems im Allgemeinen einen Mischblock mit darin angeordneten ersten und zweiten axial verbundenen, zylindrischen Mischkammern auf. Der Durchmesser der zweiten Kammer ist bevorzugt etwas größer als derjenige der ersten Kammer. Eine erste Strömung von Arzneistoff/Polymer-Lösung wird axial in die erste Kammer durch einen ersten longitudinalen, axialen Anschluss eingebracht, der in der Endwand der ersten Kammer, beabstandet von der zweiten Kammer, angeordnet ist. Eine zweite Strömung von Emulgator wird in die erste Kammer durch einen zweiten Anschluss eingebracht, der, wie der erste Anschluss, angrenzend an dasselbe Ende der ersten Kammer angeordnet ist, um die zweite Strömung im Wesentlichen orthogonal und versetzt zu der ersten Strömung einzuspeisen. Bevorzugt ist der zweite Anschluss angeordnet, um die zweite Strömung tangential zu der zylindrischen Wand der ersten Kammer einzuspeisen. Das Ende der zweiten zylindrischen Kammer gegenüber der ersten Kammer ist offen, sodass Flüssigkeit problemlos ohne Wirbelwirkung aus der zweiten Kammer austreten kann.

**[0037]** Die Fließgeschwindigkeiten der ersten und zweiten Strömungen und die Größen der ersten und zweiten Kammern sind so, dass sich beide Kammern mit den eingespeisten Lösungen füllen. Somit fließen die eingespeisten Flüssigkeiten von den ersten und zweiten Anschlüssen durch die ersten und zweiten Kammern und aus einem dritten, durch das offene Ende der zweiten Kammer gebildeten Anschluss. Die tangential durch den zweiten Anschluss eingespeiste Emulgator-Strömung weist, aus dem Flüssigkeitsfluss durch die Kammern, auch eine axiale Geschwindigkeitskomponente auf, wodurch sie eine im Allgemeinen schraubenförmige Bahn zur Folge hat. Dies führt zu einer kontrollierten Turbulenz innerhalb der ersten Kammer, die ausreicht, um eine Emulsion von Tröpfchen zu erzeugen, die durch die Arzneistoff/Polymer-Lösung gebildet wird, die bei Eintritt in die erste Kammer mit dem Emulgator in Kontakt kommt, jedoch ohne die Größe der anfangs gebildeten Tröpfchen nennenswert zu verringern.

**[0038]** In der zweiten Kammer werden die Tröpfchen durch ein Vernetzungsmittel vernetzt, das über einen vierten Anschluss eingebracht wird, der so positioniert ist, dass eine Strömung von Vernetzungslösung einschließlich des Vernetzungsmittels in die zweite Kammer orthogonal und versetzt zu der Längsachse der zweiten Kammer eingespeist wird. Bevorzugt ist der vierte Anschluss zur Einspeisung der Vernetzungsströmung tangential zu der zylindrischen Wand der zweiten Kammer positioniert, um einen turbulenten, schraubenförmigen Fluss des Vernetzungsmittels zu erzeugen.

**[0039]** Den Erfolg eines solchen Systems bewirken möglicherweise mehrere Parameter. Beispielsweise besitzen Lösungsmittleigenschaften, wie Polarität und Hydrophilie, einen potentiellen Einfluss auf Mischbarkeit, Arzneistoffbeladung und Wechselwirkung mit der wässrigen Emulsion. Die Fließgeschwindigkeiten in die Mischkammern des Systems besitzen eine potentielle Auswirkung auf die Mischeigenschaften und Turbulenz innerhalb des Mischblocks, die wiederum die Mikropartikelgröße, Größenverteilung der Mikropartikel und die Wahrscheinlichkeit des Verklumpens innerhalb der Mischkammern beeinflussen. Die Konzentration des Vernetzungsmittels besitzt eine potentielle Auswirkung auf die Geschwindigkeit und Gründlichkeit des Vernetzungsprozesses. Wasch- und Filtrierprozesse besitzen eine mögliche Auswirkung auf Arzneistoffauswaschung, Kleinpartikelverlust und Mikropartikelagglomeration.

**[0040]** Wie hier verwendet, umfassen die folgenden Abkürzungen und Begriffe die folgenden Definitionen, sind aber nicht notwendigerweise darauf beschränkt:

**[0041]** "ICAM-1" soll interzelluläres Adhäsionsmolekül ICAM-1 bedeuten und wird verwendet, um sowohl die Formen von ICAM-1 mit voller Länge (transmembran) als auch diejenige mit gekürzter Länge (nicht transmembran), bestimmte biologisch aktive Fragmente und Kombinationen von Funktionsanalogen und Derivate davon, und einschließlich insbesondere t-ICAM-453, zu bezeichnen.

**[0042]** "LVCR" soll niederviskoses Natriumalginat bedeuten.

**[0043]** "Mikropartikel" soll eine kleine, im Wesentlichen feste Agglomeration eines Ziel-Arzneistoffes und eines Polymers bedeuten, die einen Durchmesser von etwa 20 µm und etwa 80 µm aufweist und in Größe und Arzneistoffverteilung reproduzierbar ist und kontrollierte Abbaueigenschaften aufweist.

**[0044]** "Reynolds-Zahl" ist eine dimensionslose Zahl, die wesentlich ist beim Aufbau eines Modells eines beliebigen Systems, bei dem die Wirkung der Viskosität bei der Kontrolle der Geschwindigkeiten oder des Fließmusters eines Fluids von Bedeutung ist, wie durch die Formel:

$$\frac{DVL}{\mu}$$

ausgedrückt, wobei  $D$  der Dichte einer Flüssigkeit entspricht,  $V$  der Geschwindigkeit der Flüssigkeit entspricht,  $L$  dem Durchmesser des Anschlusses oder der Kammer, durch die sich die Flüssigkeit bewegt, entspricht und  $\mu$  der Flüssigkeitsviskosität entspricht.

**[0045]** "Alginat" soll eine Familie von Copolymeren mit 1,4-verknüpften  $\beta$ -D-Mannuron- und  $\alpha$ -L-Guluronsäure-Resten in variierenden Anteilen und aufeinander folgender Anordnung bedeuten.

**[0046]** "Arzneistoff" soll jede Substanz bedeuten, die zur Verwendung bei der Diagnose, Heilung, Linderung, Behandlung oder Vorbeugung einer Krankheit, einschließlich von allen pharmakologisch aktiven Proteinen und Peptiden und einschließlich von kleinen Molekülen, Hormonen, Polypeptiden, Impfstoffen und Komponenten davon, vorgesehen ist.

**[0047]** "Emulsion" soll das Ergebnis der Kombination von zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten, wie Ethylacetat und LVCR, bedeuten, wobei eine Flüssigkeit als kleine Tröpfchen in der anderen Flüssigkeit dispergiert ist.

**[0048]** Die Ausführungsform des erfindungsgemäßen Systems, das in Querschnitt in [Fig. 1](#) beispielhaft erläutert ist, ist ein halbkontinuierliches Durchflusssystem, einschließlich eines Mischblocks (100) mit axial verbundenen zylindrischen Mischkammern (102, 108) und darin ausgebildeten Anschlüssen (104, 106, 110). Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, weist der Mischblock (100) einen ersten Mischblock (132) mit einer ersten Mischkammer (102) darin und einen zweiten Mischblock (134) mit einer zweiten Mischkammer (108) darin auf. Die zweite Mischkammer (108) weist eine Vielzahl von Durchgängen (110, 113) auf, um die Emulsion und eine Vernetzungslösung hindurchzuleiten. Die beiden Blöcke (132, 134) können getrennte Blöcke sein, die entweder über einen biegsamen Schlauch oder einen starren Durchgang verbunden sind. Alternativ, und wie nachstehend in Verbindung mit [Fig. 4](#) diskutiert, können die beiden Mischkammern (102, 108) in einen einzigen Mischblock eingebaut sein.

**[0049]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die Mischblöcke (132, 134) aus einem nichtmetallischen Material, wie Teflon™ oder Delrin™, die beide allgemein im Handel erhältlich sind, gebildet. Alternativ können die inneren Oberflächen der Mischkammern (102, 108) mit einem Antihafmaterial, wie Teflon™, Delrin™, oder einem anderen nicht benetzenden synthetischen Material überzogen oder daraus gebildet sein, da Natrium- oder Kalziumalginat auf metallischen Oberflächen ausfallen kann, was zur Blockade von einem oder mehreren der Anschlüsse (104, 106, 110, 113) führen könnte, sofern sie metallische Oberflächen aufweisen. Wenn beispielsweise eine Kalziumsalz enthaltende Vernetzungslösung in Aceton oder Ethanol mit einem Polymer in Gegenwart eines Metalls in Kontakt kommt, rufen die Oberflächeneffekte des Metalls eine Agglomeration der Mikropartikel und Verstopfen der Anschlüsse hervor. Eine weitere Alternative wäre die Verwendung eines Teflon™-Rohreinsatzstückes in den Kammern (102, 108, 110) und eines internen dritten Anschlusses (113), um die Oberflächeneffekte mit Metall zu verringern.

**[0050]** Bei einer Ausführungsform weist die zweite Mischkammer (108) einen zugeschalteten statischen Mischer (112) auf, um die Turbulenz in dieser Kammer (108) zu erhöhen. Der Mischer (112) kann eine Spirale mit schroffen Ecken sein, die eine gewundene Bahn für die einfließende Emulsion bereitstellt. Es können weitere Vorrichtungen verwendet werden, um den Emulsionsfluss durch und/oder in die zweite Kammer (108) zu erhöhen und um die Turbulenz in dieser Kammer (108) zu erhöhen. Es kann allerdings möglich sein, genügend Turbulenz ohne eine zusätzliche Mischvorrichtung zu erzeugen, indem die Fließgeschwindigkeiten der Strömungen durch die verschiedenen Anschlüsse (104, 106, 110, 113) eingestellt werden.

**[0051]** Der Mischblock (100) kann jede zur Fertigung in kommerziellem Rahmen geeignete Größe aufweisen. Bei der dargestellten Ausführungsform von [Fig. 4](#) ist der feste Block (400) aus Delrin™ gefertigt und misst etwa 7,6 cm × 5,1 cm × 5,1 cm. Bei dieser Ausführungsform beträgt der Durchmesser der vorderen Kammer (404) 0,32 cm (0,125 in.), und der Durchmesser der breiteren Kammer (406) beträgt 0,48 cm (0,19 in.). Die gesamte Innenlänge der Kammer (402) beträgt etwa 8,4 cm (3,5 in.). Andere Größen können, wie gewünscht, mit geeigneten Parameter-Einstellungen verwendet werden. Bei dieser dargestellten Ausführungsform weist der Mischblock (400) eine einzige Mischkammer (402) auf, mit einem ersten "Pfannenstiel"-Segment (404) und einem größeren Segment (406). Die Pfeile geben die Richtung der Strömungsflüsse in die Kammer und aus der Kammer (402) an. Die Gesamtlänge des Mischblocks (400) beträgt etwa 5,1 cm, und das enge Segment der Mischkammer (404) weist einen Durchmesser von etwa 0,32 cm auf, wobei es sich im größeren Segment (406) auf etwa 0,48 cm im Durchmesser erweitert.

**[0052]** Im Grunde genommen liegt ein erster Anschluss (104) entlang der horizontalen Achse des Blocks (100). Eine Arzneistoff/Polymer-Lösung, die nachstehend ausführlicher erläutert wird, wird mit einer vorbe-



stimmten Fließgeschwindigkeit durch den ersten Anschluss (104) und in die erste Mischkammer (102) eingebracht. Ein zweiter Anschluss (106) ist im Wesentlichen orthogonal zu der Innenwand der ersten Kammer (102) und versetzt zu der Linie der Strömung, die von dem ersten Anschluss (104) fließt, positioniert. Ein Emulgator wird mit einer vorbestimmten Fließgeschwindigkeit durch diesen Anschluss (106) und in die erste Mischkammer (102) eingebracht, um eine Emulsion mit der Arzneistoff/Polymer-Lösung innerhalb der ersten Mischkammer (102) zu bilden. Bei der dargestellten Ausführungsform von [Fig. 4](#) weisen beide Anschlüsse (408, 410) denselben Innendurchmesser von 0,034 cm auf.

**[0053]** Es ist möglich, den Innendurchmesser eines Anschlusses gegenüber dem anderen zu variieren und die relativen Fließgeschwindigkeiten der beiden Komponenten einzustellen und immer noch Mikropartikel mit einem gewünschten durchschnittlichen Durchmesser zu erhalten. Eine kleine Änderung des Innendurchmessers eines Anschlusses kann die Turbulenz, wie durch die Reynolds-Zahl ausgedrückt, und somit die Größe der erhaltenen Mikropartikel beeinflussen.

**[0054]** Der Anschluss (412), durch den die Vernetzungslösung eingebracht wird, ist zu der Linie der Emulsionsströmung versetzt und besitzt einen etwas größeren Durchmesser als die anderen beiden Anschlüsse, d. h. etwa 0,16 cm.

**[0055]** Wie in [Fig. 4A](#) dargestellt, die vergrößert und nicht maßstabsgetreu gezeichnet ist, weisen die Anschlüsse jeweils normale Rohrgewinde (NPT)-Fittings (452), wie Swagelok® Fittings, ausgerüstet mit Schlauch (450), der in die Mischkammer (402) führt, auf. Bei diesem dargestellten Beispiel ist der Schlauch (450) in einem NPT-Fitting (452) an jedem der Anschlüsse (408, 410, 412) befestigt. An den Anschlüssen (408, 410) ist der Anschlussdurchmesser vorzugsweise kleiner als der Innendurchmesser der Schlauch, sodass es dort zu keiner Fließunterbrechung der Arzneistoff/Polymer-Lösung kommt, wenn sie in die Kammer (402) eintritt.

**[0056]** Eine Turbulenz, die von den entsprechenden Lösungs-Strömungen erzeugt wird, die aus den Anschlüssen (408, 410) fließen, hilft sicherzustellen, dass der größte Teil des Polymers mit dem Emulgator in Kontakt kommt. Während die Emulsion gebildet wird, bewegt sie sich in das größere Segment der Mischkammer (406), wo sie auf eine Strömung von Vernetzungsmittel trifft, die aus dem dritten Anschluss (412) fließt. Die in diesem Segment der Mischkammer (406) erzeugte Turbulenz wird von der Vernetzungsmittel-Lösungsströmung und dem Fluss der Emulsion von dem Pfannenstiel-Segment der Mischkammer (404) erzeugt. Die so erhaltenen Mikropartikel und das Lösungsmittel werden sodann durch den Ausgangsanschluss (414) des größeren Segments der Kammer (406) heraus gepresst.

**[0057]** [Fig. 4C](#), die vergrößert und nicht maßstabsgetreu gezeichnet ist, zeigt die Mischkammer (404) im Querschnitt. Bei dieser dargestellten Ausführungsform, liegt der erste Anschluss (408) entlang der Längsachse und bringt die Arzneistoff/Polymer-Lösungsströmung in den "Pfannenstiel"-Teil (404) der Kammer ein. Der zweite Anschluss (410), durch den ein Emulgator eingebracht wird, ist so ausgerichtet, dass die Außenwand des zweiten Anschlusses (410) orthogonal zur Innenwand der Kammer (404) ist, um die Emulgator-Strömung tangential zu der Arzneistoff/Polymer-Lösungsströmung einzubringen. Wie beispielhaft erläutert, ist der zweite Anschluss (410) versetzt zu der Ausrichtung des ersten Anschlusses (408).

**[0058]** Der Betrag der Versetzung des zweiten Anschlusses (410) zu dem ersten Anschluss (408) reicht aus, um eine Turbulenz von Arzneistoff/Polymer-Tröpfchen und Emulgator innerhalb der Kammer an (404) zu erzeugen. Besonders bevorzugt kreuzen sich die entsprechenden Strömungen der Anschlüsse (408) und (410) nicht. Die Vorwärtsbewegung der Strömung aus Anschluss (408), zusammen mit der tangentialen Bewegung der Strömung aus Anschluss (410), bildet eine schraubenförmige Bahn durch den engeren Teil (404) der Kammer und in den größeren Teil (406) der Kammer und schließlich aus dem Ausgangsanschluss des Blocks (414).

**[0059]** Gleichermaßen und wie in [Fig. 4B](#) gezeigt, ist der dritte Anschluss (412) im Wesentlichen orthogonal zu der Innenkammer (406) und versetzt zu der Emulsions-Strömung, die in die Kammer (406) eintritt, positioniert.

**[0060]** Das Einbringen sowohl der Arzneistoff/Polymer-Lösung als auch des Emulgators entlang derselben Achse, d. h. koaxiales Einbringen der beiden Lösungen in die erste Mischkammer, stellt keine Mikropartikel der gewünschten Größe her. Die Menge an Turbulenz, die innerhalb der ersten Mischkammer (102) hervorgerufen wird, wird durch die Richtung des Einbringens des Emulgators und der Arzneistoff/Polymer-Lösung beeinflusst. Das Einbringen der Emulgator-Strömung, im Wesentlichen tangential zu der Wand der Kammer (102) und versetzt zu der Arzneistoff/Polymer-Lösungsströmung, erzeugt genug Turbulenz, um Mikropartikel des ge-



wünschten Größenbereichs herzustellen.

**[0061]** [Fig. 5](#) zeigt eine alternative Ausführungsform eines zweiten Mischblocks (**500**), der eine zweite Mischkammer (**502**) zum Einbringen einer Vernetzungsmittel-Strömung in die Emulsion enthält, wobei er sich von einer ersten Mischkammer (nicht gezeigt) in die zweite Mischkammer (**502**) durch einen Einlassanschluss (**506**) bewegt. Bei der dargestellten Ausführungsform wird ein standardmäßiger Kurzschlauch-Aufbau verwendet, um die Emulsion von der ersten Mischkammer (nicht gezeigt) in die zweite Mischkammer (**502**) einzubringen.

**[0062]** Der Durchmesser der dargestellten Mischkammer (**502**) beträgt etwa 0,95 cm. Der Anschluss (**504**) ist positioniert, um das Vernetzungsmittel tangential zur zylindrischen Wand davon einzubringen, wobei darin ein turbulenter schraubenförmiger Fluss erzeugt wird. Anschluss (**504**) ist nicht versetzt zu Anschluss (**506**), durch den die Emulsion in die Kammer eintritt.

**[0063]** [Fig. 6](#) erläutert beispielhaft eine alternative Ausführungsform eines zweiten Mischblocks (**600**), der eine zweite Mischkammer (**602**) enthält, in die das Vernetzungsmittel und die Emulsion eingebracht werden. Bei dieser Ausführungsform wird ein ringförmiges T-Stück zum Mischen (**604**) verwendet, um die Emulsion von der ersten Mischkammer (nicht gezeigt) in die zweite Mischkammer (**602**) einzubringen.

**[0064]** Der Außendurchmesser des ringförmigen T-Stücks (**604**) beträgt etwa 0,64 cm, und der Innendurchmesser der Mischkammer (**602**) beträgt etwa 0,95 cm. Der Durchmesser des Anschlusses (**606**), durch den das Vernetzungsmittel eingebracht wird, beträgt etwa 0,95 cm.

**[0065]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird ein niedermolekulares Polymer (LVCR) als das Polymer verwendet, und ICAM-1 wird als der Arzneistoff verwendet. Das LVCR wird in Wasser bei einer Konzentration von etwa 1% Gew./Gew. gelöst, und ICAM-1 wird bis zu einer ICAM-1-Endkonzentration von 0,11% Gew./Gew. zugegeben. Dies führt in dem Endprodukt zu einer theoretischen ICAM-1-Beladung von etwa 5–15%, besonders bevorzugt von etwa 10%. Andere Prozentanteile von sowohl Polymer als auch Arzneistoff können je nach Fließgeschwindigkeiten, spezifischem Polymer und spezifischem zu ladenden Arzneistoff verwendet werden. Die Arzneistoff/Polymer-Lösung kann auch Puffersalze des für den entsprechenden Arzneistoff geeigneten Typs enthalten. Beispielsweise kann ein TRIS- oder Histidin-Puffer bei der Herstellung und Lagerung des ICAM-1 verwendet werden, somit sind in der LVCR-Lösung Salze dieser Puffer vorhanden. Diese Puffer können ebenfalls zu der Arzneistoff/Polymer-Lösung zugegeben werden, um den pH-Wert und möglichen Abbau des ICAM-1 zu kontrollieren.

**[0066]** Das zur Bildung der Mikropartikel bevorzugte Polymer ist Natriumalginat, das im Handel von Merck & Co. (Kelco Division, USA, Rahway, N.J.) erhältlich ist, und besonders bevorzugt ein niedermolekulares Natriumalginat. Natriumalginat, die bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen: Keltone HV<sup>TM</sup>, Keltone LV<sup>TM</sup>, Kelgin HV<sup>TM</sup>, Kelgin MV<sup>TM</sup>, Kelgin LV<sup>TM</sup>, Manucol DMF<sup>TM</sup>, Manucol DH<sup>TM</sup>, Manucol LD<sup>TM</sup> und Manugell DMB<sup>TM</sup>, die alle von Merck & Co., Kelco Division USA, im Handel erhältlich sind. Weitere Alginat sind von Kibun Chemical Col oder Pronova Biopolymers erhältlich.

**[0067]** Weitere Polymere können bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden, die die gewünschten Freisetzeigenschaften für den Ziel-Arzneistoff, der von den Mikropartikeln freigesetzt wird, oder die die gewünschten bioadhäsiven Eigenschaften, wie sie für einen bestimmten Arzneistoff oder ein Abgabesystem geeignet sind, aufweisen.

**[0068]** Weitere Polymere, die in der Arzneistoff-Lösung verwendet werden können, können unter anderem Natriumkalziumalginat, Kaliumalginat, Propylenglycolalginat, Xanthanlösung und Gellangummi, hydrophile Cellulosepolymere und natürliche Proteine und synthetische Proteine enthalten. Die Polymerauswahl hängt von dem betreffenden Arzneistoff, der geladen werden soll, ab.

**[0069]** Ein bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Systems verwendeter Arzneistoff ist t-ICAM-453, der von Bayer Corporation, Pittsburgh, PA, als eine 1 bis 2% t-ICAM-453-Lösung, gepuffert mit TRIS-HCl, bereitgestellt wird. Der Arzneistoff kann zunächst tiefgefroren, gefriergetrocknet oder in einer gepufferten Lösung bei einer für den jeweiligen Arzneistoff geeigneten Konzentration vorliegen. Die tiefgefrorenen Arzneistoffproben werden anschließend dem LVCR oder einer anderen geeigneten Polymer-Lösung zugegeben.

**[0070]** Bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung mit Bezug auf [Fig. 1](#) wird die Arzneistoff/Polymer-Lö-

sung über einen Schlauch (nicht gezeigt), der bevorzugt aus einem Teflon<sup>TM</sup>- oder einem anderen nichtmetallischen Material gefertigt ist, durch den ersten Anschluss (104) in die erste Mischkammer (102) gepumpt. Der Schlauch ist in Anschluss (104) an einem Ende befestigt und ist am anderen Ende mit einer Strömungsregelungspumpe (nicht gezeigt) verbunden. Die Arzneistoff/Polymer-Lösung wird in die erste Mischkammer (102) mit einer vorbestimmten Fließgeschwindigkeit eingebracht, die eine Turbulenz innerhalb der ersten Kammer erzeugt, die ausreicht, um Polymertröpfchen zu erzeugen, ohne die Größe der Partikel nennenswert zu verringern.

**[0071]** Im Wesentlichen gleichzeitig wird ein Emulgator in die erste Mischkammer (102) über einen Schlauch (nicht gezeigt) eingebracht, der in dem zweiten Anschluss (106) an einem Ende befestigt ist und von einer Strömungsregelungspumpe (nicht gezeigt) am anderen Ende kontrolliert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform zur Herstellung ICAM-1-beladener Mikropartikel ist der Emulgator Ethylacetat und besonders bevorzugt ein benetztes Ethylacetat (etwa 2,8–3%). Der Emulgator ist bevorzugt gesättigt (mit Wasser), um zu verhindern, dass der Emulgator die Wasserbasis-Lösung des Arzneistoffes dehydratisiert und einen Aufbau aufgrund von Phasenwechselwirkungen zwischen dem Emulgator und der Arzneistoff/Polymer-Lösung verursacht. Insbesondere wenn Ethylacetat in einem ICAM-1-System verwendet wird, ist Wasser aus der Arzneistoff/Polymer-Lösung in dem Ethylacetat bei Konzentrationen unter 3% löslich. In diesem Fall dehydratisiert Ethylacetat die Alginat-Emulsion und produziert ein hoch viskoses Gel. Dieses Problem kann gelöst werden, indem das Ethylacetat auf ein Niveau von etwa 2,8% oder mehr vor der Verwendung vorab benetzt wird. Bei anderen Ausführungsformen, wenn der Arzneistoff nicht in einem Lösungsmittel auf Wasserbasis vorliegt, kann es möglich sein, andere, nicht gesättigte, nicht wechselwirkende Emulgatoren zu verwenden.

**[0072]** Bei der erfindungsgemäßen ICAM-1 Ausführungsform ist Ethylacetat als das Emulsions-bildende Lösungsmittel bevorzugt, da es nur teilweise in Wasser mischbar, vollständig mit Vernetzungs-Lösungsmitteln, die nachstehend im Einzelnen besprochen werden, mischbar ist und GRAS (d. h. allgemein als sicher anerkannt) ist, Lebensmittelreinheit aufweist und kostengünstig ist.

**[0073]** Ein System, das 70/30 Aceton/Ethanol als das Vernetzungs-Lösungsmittel und 0,5 mM TRIS-Lösungskonzentration in LVCR/ICAM-1 gepufferten Proben verwendet, ergibt eine theoretische ICAM-1-Beladung von 66%. Wird eine 10 mM TRIS-gepufferte Probe verwendet, ergibt sich eine theoretische ICAM-1-Beladung von 100%. Die Wirkung der Pufferkonzentration auf die ICAM-1-Beladung in einem reinen Ethanol-System ist weniger dramatisch. Unter identischen Betriebsbedingungen produziert ein 0,5 mM TRIS-Puffer eine ICAM-1-Beladung von 67%, und ein 10 mM TRIS-Puffer produziert eine ICAM-1-Beladung von 65%.

**[0074]** Bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung kann eine Puffer-Lösung zunächst durch den Anschluss (104) in die erste Mischkammer (102) geleitet werden, bevor entweder die Arzneistoff/Polymer-Lösung oder der Emulgator eingebracht wird, um die Mischkammer vorab zu befüllen und um die mit dem System verbundenen Pumpen ansaugen zu lassen. Wenn sowohl die Lösung als auch der Emulgator gleichzeitig in die erste Mischkammer (102) über die beiden Anschlüsse (104, 106) eingebracht werden, wird eine Emulsion gebildet. Die innerhalb des ersten Mischblockes (102) durch die entgegenwirkenden Lösungsströmungen, die in den ersten Mischblock (102) eintreten, erzeugte Turbulenz, bricht die untergeordnete Flüssigkeit (d. h. das LV-CR) in einzelne Tröpfchen auf. Die Größe der Tröpfchen hängt von der Menge an Turbulenz in der Kammer und den Eigenschaften beider Flüssigkeiten ab, die sich auf die Reynolds-Zahl des Systems bei der Kammer bezieht. Je höher die Reynolds-Zahl, desto kleiner die Mikropartikelgröße. Je viskoser die beiden Lösungen, desto schwieriger ist es außerdem, eine Turbulenz zu erzeugen.

**[0075]** Sobald die Mikropartikel in der ersten Mischkammer (102) gebildet sind, fließen sie in eine zweite Mischkammer (108). Die zweite Mischkammer (108) befindet sich bevorzugt neben dem ersten Mischblock (102), um den Fluss der Emulsion, die die Mikropartikel enthält, zu erleichtern. Bei einer bevorzugten Ausführungsform grenzt die zweite Mischkammer (108) unmittelbar an die erste Mischkammer (102) an, wie in [Fig. 1](#) beispielhaft erläutert.

**[0076]** Wenn die zweite Mischkammer (108) nicht unmittelbar an die ersten Mischkammer (102) angrenzt, kann die Emulsion von der ersten Mischkammer (102) in eine vergrößerte zweite Mischkammer übergeführt werden, die eine Menge eines Vernetzungsmittels enthält. Bei einer solchen Ausführungsform tritt die Vernetzung im Wesentlichen gleichzeitig, d. h. in weniger als etwa 2 Sekunden, auf; die Verweilzeit in der Kammer kann sich allerdings, abhängig von der Mikropartikel-Zusammensetzung und dem Vernetzungsmittel, von ein paar Stunden auf ein paar Tage ausweiten, um die Mikropartikel weiter zu dehydratisieren.

**[0077]** Wenn die zweite Mischkammer (108) unmittelbar an die ersten Mischkammer (102) angrenzt, wie in

**Fig. 1** beispielhaft erläutert, wird die Emulsion direkt von der ersten Mischkammer (**102**) in die zweite Mischkammer (**108**) übergeführt. Wenn die Emulsion über den dritten Anschluss (**113**) in die Kammer (**108**) eintritt, wird eine Strömung von Vernetzungsmittel-Lösung bei einer vorbestimmten Fließgeschwindigkeit über einen vierten Anschluss (**110**) in die zweite Mischkammer (**108**) eingebracht. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der vierte Anschluss (**110**) senkrecht zur Längsachse der Mischkammer (**108**) und versetzt zu der Linie der Emulsionsströmung, um die Vernetzungsströmung im Wesentlichen tangential zum Fluss der Emulsion einzubringen.

**[0078]** Ein wichtiger Parameter bei der erfolgreichen Herstellung von Mikropartikeln mit dem gewünschten durchschnittlichen Durchmesser und Arzneistoffbeladungs-Eigenschaften ist die Fließgeschwindigkeit der in die Mischkammern eingebrachten Lösungen. Bei dem in Beispiel 1 beschriebenen System zur Herstellung von ICAM-1-beladenen Alginat-Mikropartikeln beträgt die Fließgeschwindigkeit der Arzneistoff/Polymer-Lösung in die erste Mischkammer etwa 5 bis 10 ml/min, und der Emulgator wird in die erste Mischkammer bei einer Fließgeschwindigkeit von etwa 50 und 80 ml/min eingebracht. Eine Reihe von Durchläufen unter Verwendung von einer 1 Gew./Gew. LVCR-Lösung, vorab benetztem Ethylacetat und einem Kalziumchlorid-Vernetzungsmittel wurden unter Verwendung des Systems von **Fig. 1** durchgeführt. Nach Sammeln und Trocknen wurde jede Probe durch ein 250-µm-Sieb gesiebt, um, als Indikator für die Menge an auftretender Agglomeration, die größeren Partikel von der Masse zu separieren. Die folgende Tabelle 1 gibt gewonnenes Bruchprodukt von weniger als 250 Mikrometer in Prozent an.

TABELLE 1

Probe-Nr.	LVCR Fließgeschwindigkeit (ml/min)	EtOAc Fließgeschwindigkeit (ml/min)	Vernetzung Fließgeschwindigkeit (ml/min)	Bruchprodukt, ausgesiebt weniger als 250 µm
1	10	50	70	95
2	10	30	70	0
3	10	80	70	84
4	15,3	50	70	92
5	15,3	30	70	flockiges Produkt
6	15,3	80	70	41
7	24	60	70	90
8	24	80	70	71
9	37	50	70	74
10	37	80	70	31
11	25	60	40	66

**[0079]** Die weitere Analyse von Partikeln mit einer Größe von weniger als 250 Mikron wurde sowohl unter Verwendung der Malvern- als auch Horiba-Größenanalyse durchgeführt. Die Malvern-Sortierung ist ein bekanntes Verfahren zur Sortierung auf der Basis der Laserbeugungsprinzipien unter Verwendung eines Malvern 2600c-Tröpfchen-und-Teilchen-Sichters, erhältlich von Malvern Instruments Co., Inc., (Southborough, MA). Die Horiba-Analyse ist ein bekanntes Verfahren zur Sortierung, auf der Basis von Teilchensedimentationsprozessen und wird unter Verwendung eines Horiba CAPA-700-Analysators zur Größenverteilung von Partikeln, erhältlich von Horiba Instruments, Inc. (Irvine, CA), durchgeführt. Die Sortierung von Partikeln in dem Horiba-Analysator basiert auf den aerodynamischen Eigenschaften der Partikel, und die Ergebnisse werden als aerodynamischer mittlerer Massendurchmesser (AMMD) und als Prozent der Partikel in repräsentativen Größenbereichen angegeben. Die folgende Tabelle 2 stellt die Ergebnisse dieser Analysen für ausgewählte Proben aus Tabelle 1 dar.

TABELLE 2

## Sortierung der Partikel

Probe-Nr.	<u>Horiba</u>			<u>Malvern</u>		
	Mittel ( $\mu\text{m}$ )	% $< 100 \mu\text{m}$	% $< 10 \mu\text{m}$	Mittel ( $\mu\text{m}$ )	% $< 100 \mu\text{m}$	% $< 10 \mu\text{m}$
1	46,3	86,4	1,9	48,2	94,7	0,9
3	58,6	73,7	1,3	65,4	86,2	0,5
7	61,1	76,7	1,0	54,0	94,1	0,6

**[0080]** Bevorzugt ist die Fließgeschwindigkeit des Vernetzungsmittels so niedrig wie möglich, um genug Turbulenz in der zweiten Mischkammer (**108**) zu erzeugen, um die Mikropartikel mit dem Vernetzungsmittel zu mischen, ohne überschüssige Turbulenz zu erzeugen, die die Größe der Partikel verringert. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird ein 1% Gew./Gew. LVCR mit ICAM-1 in die erste Mischkammer mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 5 ml/min eingebracht. Zuvor benetztes (2,8% Wasser) Ethylacetat wird in die erste Mischkammer mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 83 ml/min eingebracht.

**[0081]** Das Vernetzungsmittel kann jedes Mittel sein, das mit dem Emulgator reagiert, um die Mikropartikel zu verfestigen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird Kalziumchlorid als Vernetzungsmittel verwendet, wenn wässriges Natriumalginat verwendet wird, um die Emulsion zu bilden. Andere Kalziumsalze können verwendet werden, solange sie in dem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch löslich sind. Bei dem Vernetzungsprozess wird Natrium in Natriumalginat durch Kalzium ersetzt, wodurch ein mit ICAM-1 beladener, nicht wasserlöslicher Kalziumalginat-Mikropartikel hergestellt wird. Bei dieser Ausführungsform wird das Kalziumsalz in einer Menge eines dehydratisierenden Lösungsmittels, wie Aceton und Ethylalkohol, gelöst, das die Mikropartikel dehydratisiert. Bevorzugt umfasst die Vernetzungslösung 0,8%  $\text{CaCl}_2$  in 60 Aceton und 40% Ethanol.

**[0082]** Bei der ICAM-1/LVCR-Ausführungsform ist Kalziumchlorid in einem ausreichenden stöchiometrischen Überschuss vorhanden, um das Natriumalginat in der LVCR-Lösung vollständig zu vernetzen, ohne einen Kalziumchlorid-Niederschlag in dem Endprodukt zu erzeugen. Wenn die Kalziumchlorid-Konzentrationen zu hoch sind, führt dies außerdem zu einer überschüssigen Menge an Vernetzung, wodurch die Bildung einzelner Mikropartikel verhindert wird. Das Endprodukt ist sodann entweder eine regelmäßige Matrix aus vernetztem Material oder große (d. h. 1–2 mm) nicht kugelige Partikel.

**[0083]** Lösungsmittel, die mit dem Vernetzungsmittel verwendet werden können, umfassen Aceton, das ICAM-1 weniger leicht wie andere Lösungsmittel, wie Isopropylalkohol, zersetzt. Verschiedene Lösungsmittel können in Verbindung mit anderen Arzneistoffen verwendet werden und können zumindest teilweise von der Löslichkeit des betreffenden Arzneistoffes abhängen. Jedes Lösungsmittel hat seine Vor- und Nachteile. Aceton dehydratisiert leicht die vernetzten Mikropartikel, löst aber Kalziumchlorid nicht. Ethanol ist leicht mit anderen Lösungsmitteln in dem vorliegenden System mischbar und löst Kalziumchlorid leicht, kann allerdings zu niedrigeren Arzneistoffbeladungen führen, beispielsweise wenn es in einem ICAM-1-Beladungssystem verwendet wird, wenn der Arzneistoff in Ethanol löslich ist. Die Verwendung von Isopropylalkohol kann zu einem Schnelltrocknungsprodukt führen, das sich gut verarbeiten lässt, aber zu einer niedrigen Arzneistoffbeladung führen kann. Die Verwendung einer Aceton/Ethanol-Kombination, wie 85/15, 70/30 oder 65/35, kann zu hohen Beladungen führen, aber erhöhte Herstellungskosten aufgrund der Verwendung von zwei Lösungsmitteln aufweisen.

**[0084]** Lösungsmittel werden nach ihren Kosten, der Eignung für den Prozess und der bestehenden herkömmlichen Verwendung in der pharmazeutischen Industrie ausgewählt. Aceton kann mit Ethanol statt mit Wasser gemischt werden, da Wasser meistens mit den anderen Prozess-Lösungsmitteln nicht mischbar ist und sich im End-Abfluss abtrennt. Eine solche Phasentrennung ist für ICAM-1 beladene Mikropartikel aufgrund des möglichen Verlustes von ICAM-1 an die wässrige Phase, Agglomeration des Produktes und unvollständiger Dehydratisierung unerwünscht. Eine Menge an Ethanol, die ausreicht, um sowohl das Kalziumchlorid zu lösen als auch ein Zwei-Phasen-Gemisch in der Emission zu verhindern, ist bevorzugt.

**[0085]** Ein wichtiger Faktor bei der Bestimmung des Erfolgs des vorliegenden Systems und Verfahrens ist die Beladung und Ausbeute an Arzneistoff in den Mikropartikeln. Für ICAM-1 ist die gewünschte Ausbeute größer als 80%. Verluste bei der Gesamtausbeute umfassen ICAM-1, das an das Prozessfiltrat und Spülfiltrat verloren

geht, Verluste aufgrund der Deaktivierung des ICAM-1 und Verluste bei der Mikropartikelfraktion außerhalb des gewünschten Größenbereichs der Mikropartikel.

**[0086]** ICAM-1-Beladungsmessungen können durch Auswaschen des ICAM-1 aus den Mikropartikeln oder durch vollständiges Lösen der Mikropartikel und Analysieren der Konzentration mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Nephelometrie oder mittels anderer Verfahren bestimmt werden, die auf dem entsprechenden Fachgebiet anerkannt sind oder es werden können.

**[0087]** Die Vernetzungslösungsmittel Ethanol, 85/15 Aceton/Ethanol, 70/30 Aceton/Ethanol, 65/35 Aceton/Ethanol und Isopropanol können für ein ICAM-1/Natriumalginat-System verwendet werden, wie hier beschrieben. Die nachfolgende Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse, die von Durchläufen unter Verwendung von Isopropanol, 70/30 Aceton/Ethanol, und Ethanol als Vernetzungsmittel-Lösungsmittel erhalten wurden. Tabelle 3 zeigt den Partikel-Bruchteil mit weniger als 100 µm und die Gesamtausbeute an ICAM-1, berechnet durch Multiplizieren des Bruchteils der ICAM-1-Beladung mit dem Partikel-Bruchteil von weniger als 100 µm.

**[0088]** Wie in Tabelle 3 gezeigt, erzielte das 70/30 Aceton/Ethanol-System im Wesentlichen eine 100% Beladung von 10% ICAM-1, und 82% der Mikropartikel wiesen einen geringeren Durchmesser als 100 µm auf. Die Gesamtausbeute, wie bestimmt durch die Trockengewichtsausbeute mal abgesiebte Ausbeute, lag bei theoretischen 82%.

TABELLE 3

ICAM-1-Beladung für Isopropanol, 70/30 Aceton/Ethanol, und Ethanol als Vernetzungslösung

Probe-Nr.	Vernetzungslösung	% ICAM-1 Beladung	% weniger als 100 µm	% ICAM-1 Gesamtausbeute
1	Isopropanol	58	-	-
2	70/30 Aceton/Ethanol	100	82	82
3	Ethanol	65	98	84

**[0089]** Bei der Ausführung des erfinderischen Systems in einer kommerziellen Umgebung, und wie in [Fig. 2](#) dargestellt, können die Arzneistoff/Polymer-Lösung, Emulgator und Vernetzungslösungen jeweils zunächst in getrennten Behältern hergestellt werden (**202** bzw. **204** bzw. **206**). Jede der Lösungen kann sodann aus den Behältern (**202**, **204**, **206**) unter Verwendung eines Strömungsregelungspumpgeräts (**116**) über ein entsprechendes Sterilfilter mit Porengröße (**208**), z.B. 0,2 Mikron, übergeführt und in getrennten sterilen Lagertanks (**212** bzw. **214** bzw. **216**) aufbewahrt werden. Ein zweiter Sterilfiltrationsschritt kann vor Einbringen der Lösungen in den Mischblock (**100**) eingeschlossen werden.

**[0090]** Unter Verwendung von Strömungsregelungspumpgeräten (**116**) oder eines einzelnen Strömungsregelungspumpgerätes, das mehrere Einlässe und Auslässe aufweist, die getrennte Fließgeschwindigkeiten für jede Lösung ermöglichen, werden die Lösungen über geeignete Anschlüsse aus den sterilen Lagertanks (**212**, **214**, **216**) und in den Mischblock (**100**) gepumpt. Biegsame Schläuche können verwendet werden, um die Lösungen von jedem Behälter in den Mischblock (**100**) überzuführen.

**[0091]** Es kann bevorzugt sein, die Zufluss-Pumpgeräte (**116**) mit einer Pufferlösung für jede der Lösungen, die in den Mischblock (**100**) eingebracht wird, zu starten. Der Zufluss der Arzneistoff/Polymer-Lösung, die in die erste Mischkammer (**102**) eintritt, kann vor oder nach Beginn des Zuflusses des Emulgators beginnen. Unter gewissen Umständen kann es die Kosteneffizienz des Verfahrens erhöhen, wenn die Menge an ungenutzten Arzneistoffen, die in den Mischblock (**100**) eingebracht werden, durch Einbringen des Emulgators in die erste Mischkammer (**102**) zuerst, vor dem Einbringen der Arzneistoff/Polymer-Lösung reduziert wird.

**[0092]** Das Fließdiagramm von [Fig. 3](#) stellt ein bevorzugtes Verfahren zur Durchführung der vorliegenden Erfindung dar. Die Arzneistoff/Polymer-Lösung wird in die erste Mischkammer (**102**) eingebracht (**302**), vorzugsweise gleichzeitig mit dem Einbringen (**304**) des Emulgators in die erste Mischkammer (**102**), was zur Bildung (**306**) einer Emulsion führt, die die Mikropartikel und Lösungsmittel enthält. Die Emulsion wird sodann in die zweite Mischkammer (**108**) überführt (**308**), wonach das Vernetzungsmittel (**310**) in die Kammer (**108**) eingebracht wird.



**[0093]** Die Zeitdauer, während der die Emulsion in der ersten Kammer und die Vernetzungslösung in der zweiten Kammer verweilt, ist eine Funktion der Fließgeschwindigkeit für die einzelnen Strömungen, die in die entsprechenden Kammern fließen. Da sowohl die Bildung der Mikropartikel als auch die Vernetzung im Wesentlichen augenblicklich erfolgen, d. h. in weniger als etwa 2 Sekunden, ist in keiner Kammer eine notwendige Inkubationszeit erforderlich.

**[0094]** Wenn das Gemisch aus Mikropartikeln und Vernetzungs-Lösungsmittel aus dem Mischblock (100) austritt, wird das Gemisch über ein Filter oder Sieb (218) filtriert (312), das Mikropartikel oberhalb eines zuvor bestimmten minimalen Bereichs zurück hält. Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden ICAM-1-enthaltende Mikropartikel über ein herkömmliches, handelsübliches Filtermaterial filtriert. Das Filter kann Partikel mit einem Durchmesser von größer als etwa 20 µm sammeln, wobei Mikropartikel mit einem Durchmesser von weniger als etwa 20 µm ausgewaschen werden, möglicherweise in einen Abfall-Sammelbehälter (118). Alternativ kann das Filter (218) zunächst Partikel filtrieren, die größer sind als beispielsweise 200 µm, mit anschließender Filtration zur Entfernung der kleineren Partikel.

**[0095]** Die Partikel in Filter (218) werden anschließend einem ersten Waschen (314) unterzogen. Bei einer Ausführungsform, und wie in [Fig. 2](#) gezeigt, umfasst der erste Waschschrift (314) die Verwendung einer Strömungsregelungspumpe (116), um die erste Waschlösung aus einem Behälter (224) über ein Sterilfilter (208) und in einen Aufnahmebehälter (226) überzuführen.

**[0096]** Die erste Waschlösung kann jede dehydratisierende Lösung, wie ein Aceton, ein Alkohol, oder eine Kombination von beiden sein. Eine erste Wäsche mit etwa 10% Ethanol und etwa 90% Aceton, oder 90% Isopropanol, oder 90% Ethylacetat ist bevorzugt. Obwohl einige Lösungen den bestimmten Mikropartikel schnell und gründlich dehydratisieren können, es ist jedoch möglich, dass einige Lösungen die Wirksamkeit des Arzneistoffes, mit dem die Mikropartikel von Interesse beladen sind, beeinflussen. Der erste Waschschrift (314) soll überschüssiges Vernetzungsmittel, z.B. Kalziumchlorid, ohne Fällung entfernen. Der erste Waschschrift (314) soll ebenfalls überschüssigen Emulgator, d. h. Ethylacetat, entfernen.

**[0097]** Nach dem ersten Waschschrift (314) wird vorzugsweise ein zweiter Waschschrift (316) auf eine ähnliche Art und Weise wie der erste Waschschrift (314) durchgeführt. D. h. es wird, wie in

**[0098]** [Fig. 2](#) gezeigt, eine zweite Waschlösung über ein Strömungsregelungspumpengerät (116) aus einem Behälter (228) durch ein Sterilfilter (208) und in einen Aufnahmebehälter (230) übergeführt. Der zweite Waschschrift (316) kann unter Verwendung derselben Lösungen wie im ersten Waschschrift (314) oder einer Variation durchgeführt werden. Die Lösungen, die in dem zweiten Waschschrift (316) verwendet werden, sollten ebenfalls die Mikropartikel dehydratisieren, somit können solche Lösungen u. a. reines Aceton, Isopropanol oder Ethylacetat umfassen. Der zweite Waschschrift (316) soll den Rückstand der ersten Waschlösungen entfernen. Somit kann eine bevorzugte zweite Waschlösung 100% Aceton sein.

**[0099]** Die Mikropartikel können unter Verwendung verschiedener auf dem Fachgebiet bekannter Verfahren zurückgewonnen (232) werden. Bei einem direkten Sammelverfahren wird die Probe direkt auf einen Büchner-Trichter oder auf einem anderen Filter gesammelt, der zur kommerziellen Herstellung verwendet werden kann. Das Filtrat wird mittels angelegter Saugkraft durch das Filter gezogen, und eine Kruste von Mikropartikeln bildet sich auf dem Filter, wenn das Produkt gesammelt wird.

**[0100]** Ein anderes Sammelverfahren umfasst das Sammeln des austretenden Stroms (d. h. Mikropartikel und Lösungsmittel) in einem Behälter, Stehenlassen des Produkts für eine festgelegte Zeitdauer (z.B. 0–48 h) und anschließendes Filtrieren der Probe. Die Kontaktzeit der Mikropartikel mit dem Lösungsmittel kann den Arzneistoff oder das Protein möglicherweise aus den Mikropartikeln auswaschen, kann aber zusätzliche Dehydratisierung der Mikropartikel bereitstellen, wenn das verwendete Lösungsmittel-System eines ist, das eine hohe Affinität zu Wasser besitzt.

**[0101]** Die nach dem zweiten Waschschrift (316) auf dem Filter zurückbleibende Filterkruste kann sodann gesammelt und für einen Trocknungsschritt (318) in einen Aufnahmebehälter verbracht werden. Bevorzugt wird die filtrierte Substanz für eine verlängerte Zeitdauer, d. h. bei etwa 50 °C für mehr als 8 Stunden, in einen Vakuumtrockenofen verbracht. Zeitdauer, Temperatur und Vakuum hängen von der spezifischen Zusammensetzung der Mikropartikel und dem hergestellten Volumen ab. Die Mikropartikel können jedoch rehydratisieren und wieder bis zu 5–10% ihres Gewichts gewinnen, indem sie feuchter Raumluft ausgesetzt werden.

**[0102]** Als letzten Schritt können die getrockneten Partikel, beispielsweise mit einem System aus Mörser und



Stößel oder jedem vergleichbaren System, das dem kommerziellen Gebrauch angepasst ist, zu einem feinen, puderähnlichen Endprodukt deaggregiert (**320**) und, falls nötig, gesiebt werden, um die gewünschte Größenverteilung bereitzustellen. Ein gewünschtes Endprodukt des Verfahrens ist eine Menge nicht agglomerierter Mikropartikel innerhalb des gewünschten Durchmesser-Bereichs und mit einer Arzneistoff-Beladung innerhalb des gewünschten Bereichs.

**[0103]** Das Mikropartikel-Produkt kann sodann unter Verwendung bekannter und für den Fachmann auf dem betreffenden Gebiet verfügbarer Standard-Formulierungen für ein Gerät zur nasalen Arzneistoffabgabe formuliert werden. Die Arzneistoff-beladenen Mikropartikel, die erfindungsgemäß hergestellt wurden, haben die Eigenschaften, dass sie sich an den Nasendurchgang anheften und nach und nach den darin enthaltenen Arzneistoff in das Kreislaufsystem des Empfänger-Patienten abgeben. Das Alginat in dem Mikropartikel wechselwirkt mit der in dem Nasendurchgang enthaltenen Schleimhaut unter Bildung einer gelartigen Substanz, die sich an die Oberfläche des Nasendurchgangs heftet, wenn der Arzneistoff freigesetzt wird.

**[0104]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform eines Verfahrens zur Herstellung im kommerziellen Rahmen unter Verwendung der vorliegenden Erfindung, können die folgenden Komponentenmengen für einen Produktionsdurchlauf von 250 g verwendet werden: etwa 35 Gramm ICAM-1, etwa 70 Liter Aceton, etwa 50 Liter Ethanol und etwa 120 Liter Ethylacetat für das Verfahren. Die zugehörigen Waschschriffe können etwa 12 Liter Aceton und etwa 1 Liter Ethanol benötigen. Mehrere Mischblöcke vom Typ wie in [Fig. 4](#) gezeigt können parallel laufen, um einen gewünschten Produktionslauf zu erhalten. Alternativ können auch verschiedene parallel laufende System-Kombinationen zur kommerziellen Herstellung von ICAM-1-beladenen Kalziumalginat-Mikropartikeln betrieben werden.

**[0105]** Die folgenden nicht-einschränkenden Beispiele sind repräsentative Ausführungsformen des vorstehend beschriebenen erfinderischen Systems und Verfahrens.

#### BEISPIELE

##### Beispiel 1

**[0106]** Bei diesem Beispiel ist der Abfluss 1% Gew./Gew. LVCR und 0,11% ICAM-1, der Emulgator ist zuvor benetztes (2,8% Wasser) Ethylacetat, und die Vernetzungslösung ist 0,8% Kalziumchlorid in Ethanol. Für LVCR, das mit ICAM-1 beladen ist, liegt der gewünschte Durchmesserbereich der Partikel zwischen etwa 20 µm und 80 µm, besonders bevorzugt mit einem Mittelwert zwischen etwa 40 µm und 50 µm. Die gewünschte ICAM-1-Beladung beträgt etwa 10%, und die Zielausbeute beträgt etwa 80% bis etwa 100%.

**[0107]** Unter Verwendung des in [Fig. 4](#) gezeigten Mischblocks wird die Fließgeschwindigkeit der LVCR-Strömung von 15 bis 45 Milliliter pro Minute (ml/min) variiert, und die Fließgeschwindigkeit der Ethylacetat-Strömung wird von 61 bis 106 ml/min variiert. Tabelle 4 zeigt repräsentative Probendaten, die unter Verwendung dieser Parameter erhalten werden.

TABELLE 4

Probe-Nr.	Flüsse ml/min			Partikel-Sortierung nach Malvern		
	LVCR	EtOAc	Vernetzung	Mittel (µm)	% weniger als 104 µm	% weniger als 8,8 µm
1	15	61	70	88,4	63,8	0,3
2	22	68	70	95,0	58,8	0,3
3	28	73	70	100,6	53,4	0,2

##### Beispiel 2

**[0108]** Eine Reihe von Versuchen wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob der Durchmesser des zum Einbringen der abfließenden Strömung in die erste Mischkammer verwendeten Anschlusses eine Auswirkung auf die Größe und Verteilung der hergestellten Mikropartikel besaß.

**[0109]** Die Versuche wurden unter Verwendung des in [Fig. 4](#) beispielhaft erläuterten Systems und einer 1%

Gew./Gew. LVCR-Lösung durchgeführt. Der Innendurchmesser des LVCR-Anschlusses wurde von 0,034 cm auf 0,069 cm erhöht, und die Fließgeschwindigkeiten der LVCR-Lösung und der Ethylacetat-Lösungen wurden variiert. Die Fließgeschwindigkeit des Vernetzungsmittels wurde konstant gehalten. Die Ergebnisse solcher Versuche sind in der folgenden Tabelle 5 gezeigt:

TABELLE 5

Betriebsbedingungen und Ergebnisse der Aussiebung

Probe-Nr.	LVCR Öffnungs- Durchmesser (in.)	Flüsse ml/min			% weniger als 100 µm	% weniger als 250 µm
		LVCR	EtOAc	Vernetzung		
1	0,0135	28	89	70	27,9	40,2
2	0,0135	28	72	70	49,5	74,6
3	0,0135	31	72	70	17,9	64,0
4	0,0135	29	72	70	31,3	74,4
5	0,027	28	72	70	16,9	40,2
6	0,027	31	72	70	34,8	50,4
7	0,027	31	56	70	17,8	46,5
8	0,0135	14	62	70	49,5	95,7
9	0,0135	28	72	70	46,7	85,3

**[0110]** Die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, dass in allen Fällen über 15% der Partikel größer waren als 100 µm, und in einigen Fällen wiesen fast 50% der Partikel einen Durchmesser von mehr als 100 µm auf. Die Ergebnisse geben an, dass die Partikelgröße nicht allein vom Durchmesser des LVCR-Anschlusses abhängt. Weitere Parameter, wie Innendurchmesser der Mischkammer, Fließgeschwindigkeit und interne Turbulenz, können zusätzliche Faktoren sein, die die Partikelgröße beeinflussen.

#### Beispiel 3

**[0111]** Isopropylalkohol wurde als das Vernetzungslösungsmittel für eine ICAM-1/LVCR-Lösung verwendet. Die Daten zeigen an, dass die Mikropartikel, die unter Verwendung von Isopropylalkohol als das Vernetzungslösungsmittel hergestellt wurden, viel schneller trocknen und sich besser bearbeiten lassen als unter Verwendung von Aceton oder anderen Alkoholen hergestellte Mikropartikel.

**[0112]** Bei diesem Beispiel wurden eine LVCR-Fließgeschwindigkeit von 14 ml/min und eine Ethylacetat-Fließgeschwindigkeit von 65 ml/min in dem Block von [Fig. 4](#) verwendet. Bei Verwendung von unbeladenen Polymerlösungen war es möglich, 45 Gramm unbeladene Mikropartikel in weniger als 5 Stunden (d. h. eine Geschwindigkeit von 0,16 g/min) herzustellen. Von diesen gesammelten 45 Gramm waren 37,2 Gramm, d. h. 83%, kleiner als 100 µm.

**[0113]** Die Partikel-Sortierung auf einer Horiba-Vorrichtung der Partikel, die über ein 100-µm-Sieb gesiebt wurden, lieferte eine mittlere Größe von 47 µm, wobei 89% unter 100 µm und 4,4% unter 10 µm lagen. Somit wurden für nicht-beladene LVCRs Partikel mit dem gewünschten Mittleren Durchmesserbereich von 40 µm bis 50 µm erhalten.

#### Beispiel 4

**[0114]** Eine Reihe von Durchläufen von 50-Gramm-Mengen wurde unter Verwendung von LVCR sowohl mit als auch ohne ICAM-1 durchgeführt, um die Standhaftigkeit des erfinderischen Systems während eines Durchlaufes zu testen. Bei diesem Beispiel wurden benetztes (2,8% Wasser) Ethylacetat als Emulgator und 1% Gew./Gew. LVCR verwendet. Die festgelegte Fließgeschwindigkeit für die LVCR-Strömung betrug 15,5 ml/min, und die festgelegte Fließgeschwindigkeit für die Strömungen von Ethylacetat- und Vernetzungslösung betrug 70 ml/min. Die LVCR-Lösung wurde entweder mit 10 mM Histidin oder 10 mM TRIS gepuffert, und wenn ICAM-1 verwendet wurde, enthielt die LVCR-Lösung zudem 2,3% (Gew./Vol.) 10% ICAM-1 Gew.-%.

**[0115]** Die Ergebnisse dieser Versuche sind nachstehend in Tabelle 6 zusammengefasst.

TABELLE 6

Probe- Nr.	Puffer	Vernetzungs- lösung	% theoretische ICAM-1- Beladung	Gew.-% Produkt < 100 µm
1	TRIS, 10 mM	70/30 Aceton/EtOH	91	92
2	Histidin, 10 mM	70/30 Aceton/EtOH	81	94
3	Histidin, 10 mM	65/35 Aceton/EtOH	78	98
4	Histidin, 10 mM	65/35 Aceton/EtOH	67	86
5	Histidin, 10 mM	60/40 Aceton/EtOH	86	77
6	Histidin, 10 mM	60/40 Aceton/EtOH	93	50
7	Histidin, 10 mM	60/40 Aceton/EtOH	Kein ICAM	92
8	Histidin, 10 mM	60/40 Aceton/EtOH	Kein ICAM	76

**[0116]** Wie in dieser Tabelle 6 gezeigt, liegt die ICAM-1-Beladung in den Histidin-Proben im gleichen Bereich wie diejenige der TRIS-Probe. Die anderen Einträge zeigen, dass bei Änderung des Verhältnisses von Aceton zu Ethanol die Beladung noch etwa 80% der Theorie blieb. Die ICAM-1-Beladung der Proben war zu über 75% der theoretischen Beladung reproduzierbar.

## Beispiel 5

**[0117]** In diesem Beispiel wurden Proben, die zunächst 12 Stunden oder 3 Tage in einem Vakuumtrockenofen getrocknet wurden, nochmals für weitere 4 Stunden bzw. 10 Stunden in dem Trockenofen getrocknet. Nach der erneuten Trocknung wurden sie gewogen, sie wurden auf Raumbedingungen äquilibrieren gelassen und erneut gewogen. Die folgende Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse dieser Trocknungs-Studien.

TABELLE 7

Verlust beim zweiten Trocknen

Probe-Nr.	erste Trocknungs-dauer	RH % beim ersten Wiegen	zweite Trocknungs-dauer	RH % beim zweiten Wiegen	% Masse-verlust beim zweiten Trocknen	% Masse-verlust nach Einstellen lassen des Gleichgewichts
1	12 h	48	4 h	N/A	13,2	-
2	12 h	48	4 h	N/A	12,9	-
3	12 h	48	4 h	N/A	8,8	-
4	3 Tage	30	10 h	33	3,1	-2,5
5	3 Tage	30	10 h	33	-0,1	-7,4
6	3 Tage	30	10 h	33	28,7	20,5

**[0118]** Proben, die zunächst 12 Stunden getrocknet wurden, verloren bei der erneuten Trocknung etwa 10% Wasser. Jedoch wurden diese Proben zunächst unter feuchten Bedingungen (d. h. 48 RH) weiterverarbeitet und hätten nur das Wasser verlieren können, das sie während der Weiterverarbeitung aufgenommen hatten. Ursprünglich für 3 Tage getrocknete Proben zeigten variable Ergebnisse. In einigen Fällen wurde im Wesentlichen kein Wasserverlust nach einer zweiten Trocknung festgestellt. In anderen Fällen wurde nach einer zweiten Trocknung allerdings ein beträchtlicher Gewichtsverlust festgestellt. Bei allen Proben nahmen die Mikropartikel nach Erreichen des Gleichgewichts bei Raumbedingungen an Gewicht zu.

**[0119]** Obwohl die vorliegende Erfindung mit Bezug auf spezielle Verfahren und Zusammensetzungen beschrieben wurde, ist es selbstverständlich, dass einem Fachmann beim Betrachten der vorliegenden Erfindung Variationen und Modifikationen klar werden.

**[0120]** Beispielsweise wird vermutet, dass kleinere, von ICAM-1 abgeleitete Protein-Fragmente und Peptide, die immer noch die Virus-bindende Stelle enthalten, zur Verkapselung und Abgabe, wie hier beschrieben, wirksam sind.

**[0121]** Obwohl die bevorzugte Form der vorliegenden Erfindung bezüglich t-ICAM-453 in einem Alginat-Mikropartikel beschrieben ist, wird vermutet, dass andere Proteine und Polypeptide zur Ladung in einen Alginat-Mikropartikel geeignet sein können, und dass ICAM-1 in Verbindung mit einem anderen Material als Alginat verwendet werden kann. Es wird vermutet, dass das allgemeine erfindungsgemäße Verfahren und System zur Herstellung von ICAM-1 beladenen Mikropartikeln zur Herstellung weiterer, mit zahlreichen anderen Arzneistoffen beladenen Mikropartikeln verwendet werden kann.

**[0122]** Zahlreiche Modifikationen und Variationen bei der Erfindung, wie in den vorstehenden veranschaulichenden Beispielen beschrieben, sind dem Fachmann wahrscheinlich bekannt, und somit sollten nur solche Einschränkungen, wie sie in den beigefügten Ansprüchen vorkommen, daran vorgenommen werden.

**[0123]** Es besteht demnach die Absicht, mit den beigefügten Ansprüchen alle derartigen gleichwertigen Variationen, die im Rahmen der Erfindung, wie beansprucht, liegen, abzudecken.

### Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Bilden von arzneistoffbeladenen Mikropartikeln mit:  
 einer ersten Mischkammer, die aufweist:  
 einen ersten Anschluß, der geeignet ist, um eine erste Strömung einer ersten Lösung axial in die erste Mischkammer einzuführen, wobei die Strömung vorbestimmte Mengen des Arzneistoffes und ein Mikropartikel-bildendes Polymer aufweist; und  
 einen zweiten Anschluß neben dem ersten Anschluß, der geeignet ist, eine zweite Strömung eines Emulgators in die erste Strömung einzuführen, um eine Emulsion in der ersten Mischkammer zu bilden, wobei der zweite Anschluß einen Durchmesser und eine Ausrichtung zu der ersten Mischkammer hat, die zweite Strömung geführt ist, um die erste Lösung in kleine Partikel aufzubrechen, und der zweite Anschluß die zweite Strömung und die erste Strömung beeinflusst, um kleine Partikel zu bilden und in einer schraubenförmigen Bahn in der

ersten Mischkammer zu bewegen; und

eine zweite Mischkammer, die axial neben der ersten Mischkammer angeordnet ist, mit einem dritten Anschluß, der geeignet ist, eine Vernetzungslösung einzuführen, die eine vorbestimmte Menge an Vernetzungsmittel in einem Vernetzungslösungsmittel enthält, und zwar in die zweite Mischkammer hinein, wobei der dritte Anschluß einen Durchmesser und eine Ausrichtung zu der zweiten Mischkammer hat, wobei das Vernetzungsmittel orthogonal zu einer Achse der zweiten Mischkammer und versetzt zu dieser eingespeist wird und das Vernetzungsmittel durch den dritten Anschluß in die erste Strömung und die zweite Strömung unter Erzeugung eines turbulenten, schraubenförmigen Flusses geführt wird.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die zweite Strömung tangential zu der ersten Strömung ist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, wobei die zweite Strömung zu der ersten Strömung versetzt ist.

4. Vorrichtung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei mindestens eine der ersten und der zweiten Mischkammern ein nicht metallisches Material ist.

5. Vorrichtung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Arzneimittel eines aus der Gruppe ist, die besteht aus: interzelluläres Adhäsionsmolekül ICAM-1, Proteinen, Peptiden, Impfstoffen und wasserlöslichen Arzneimitteln.

6. Vorrichtung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Polymer ein Alginat ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, wobei das Alginat ausgewählt wird aus Natriumalginat, Natriumkalziumalginat; Kaliumalginat und Propylenglycolalginat.

8. Vorrichtung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei der Emulgator aus Ethylacetat und Hexan ausgewählt ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, wobei der Emulgator Ethylacetat, welches mit Wasser vorbenetzt ist, aufweist.

10. Vorrichtung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Vernetzungsmittel Kalziumchlorid ist.

11. Vorrichtung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Vernetzungslösungsmittel ausgewählt ist aus Isopropylalkohol, Ethanol, Gemischen von Aceton/Ethanol.

12. Vorrichtung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei die erste Mischkammer bei der zweiten Mischkammer angrenzend ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei das Arzneimittel ICAM-1 ist, wobei das Polymer Natriumalginat aufweist, der Emulgator vorbenetztes Ethylacetat aufweist, das Vernetzungsmittel Kalziumchlorid aufweist und das Vernetzungslösungsmittel ein Ethanol/Aceton-Gemisch aufweist.

14. Verfahren zur Herstellung arzneistoffbeladener Mikropartikel mit den Schritten:

A. Einführen einer Strömung mit einem Alginat und des Arzneistoffes mit einer vorbestimmten Fließgeschwindigkeit in eine erste Mischkammer, um Alginattropfen, welche den Arzneistoff enthalten, zu bilden;

B. Einführen einer Strömung eines Emulgators mit einer vorbestimmten Fließgeschwindigkeit in die erste Mischkammer;

C. Bilden einer Emulsion der Alginattropfen und des Emulgators in der ersten Mischkammer; und

D: Transportieren der Emulsion aus der ersten Mischkammer und in einen Behälter hinein, welcher eine Menge von Vernetzungsmittel enthält; und

E. Einführen eines Vernetzungsmittels mit einer vorbestimmten Geschwindigkeit in die zweite Mischkammer, um Mikropartikel von das Arzneimittel enthaltendem Alginat zu bilden.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Schritt des Einführens der Emulsionsströmung ferner das Einführen der Emulsionsströmung in die erste Mischkammer hinein tangential zu der Alginat- und Arzneistoffströmung aufweist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, ferner mit dem Einführen der Emulgatorströmung in die erste Mischkammer versetzt zu der Alginat- und Arzneistoffströmung.

17. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Schritt des Einführens eines Vernetzungsmittels ferner das Einführen des Vernetzungsmittels tangential zu der Emulsionsströmung und in die zweite Mischkammer hinein aufweist.

18. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Arzneistoff intrazelluläres Adhäsionsmolekül ICAM-1 aufweist.

19. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Alginat eines aus der Gruppe der Alginate ist, die bestehen aus: Natriumalginat; Natriumkalziumalginat, Kaliumalginat und Propylenglycolalginat.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das Alginat Natriumalginat ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der Emulgator einer aus der Gruppe von Lösungsmitteln ist, die aus Ethylacetat und Hexan bestehen.

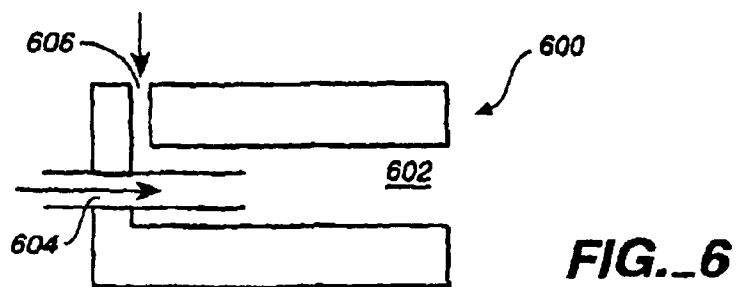
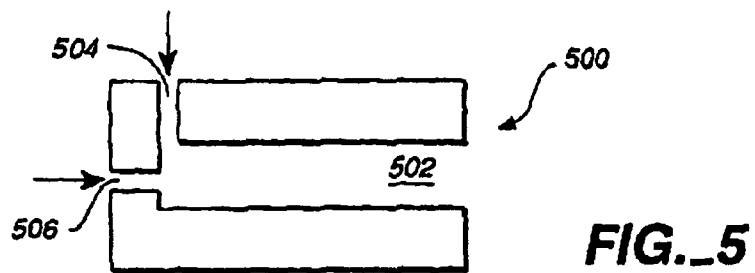
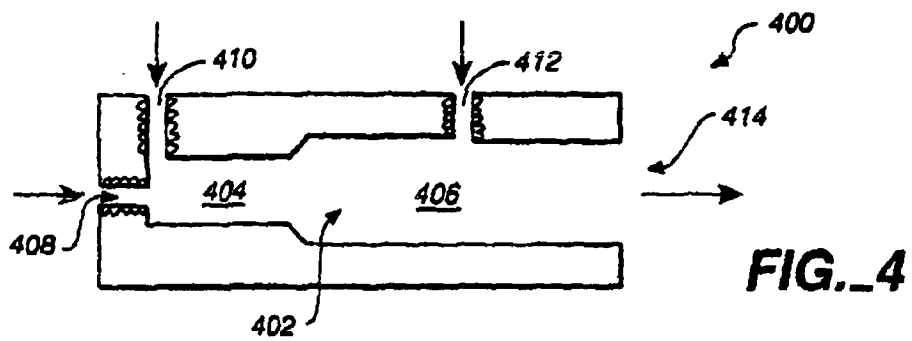
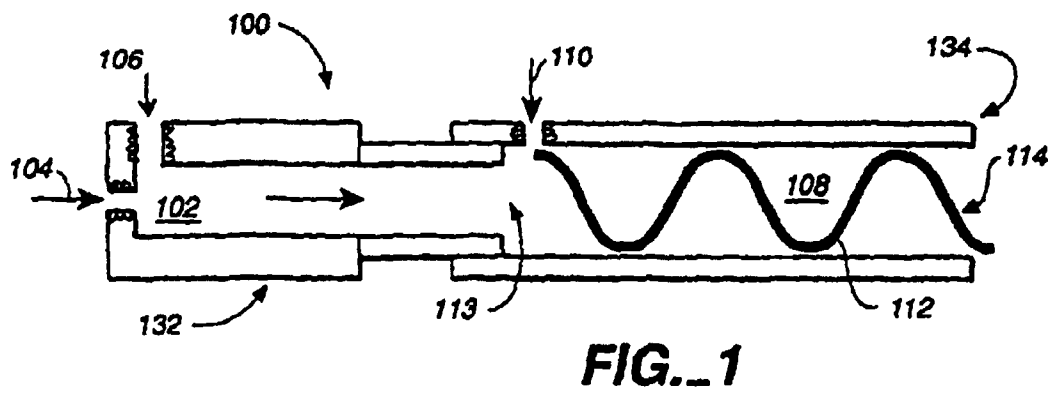
22. Verfahren nach Anspruch 19, ferner mit dem Schritt des Spülens der Mikropartikel, nach dem Schritt des Vernetzens, mit einer Spüllösung zum Dehydratisieren der Mikropartikel.

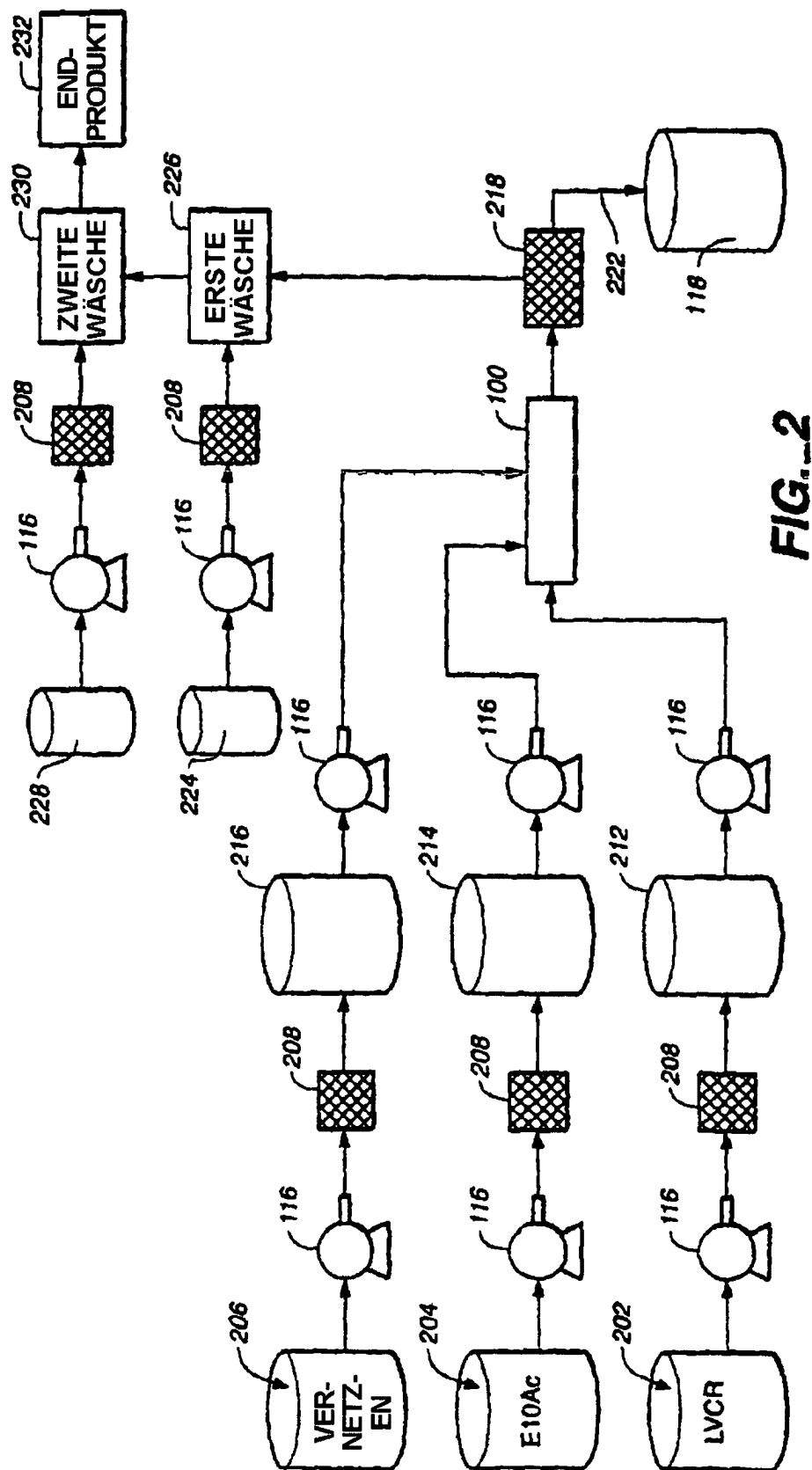
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Spüllösung eines aus der Gruppe ist, welche Ethylacetat, Isopropanol, Ethanol und Gemischen aus diesen aufweist.

24. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Arzneimittel ICAM-1 ist, das Alginat Natriumalginat ist, der Emulgator mit Wasser vorbenetztes Ethylacetat ist und das Vernetzungsmittel ein Kalziumchlorid aufweist.

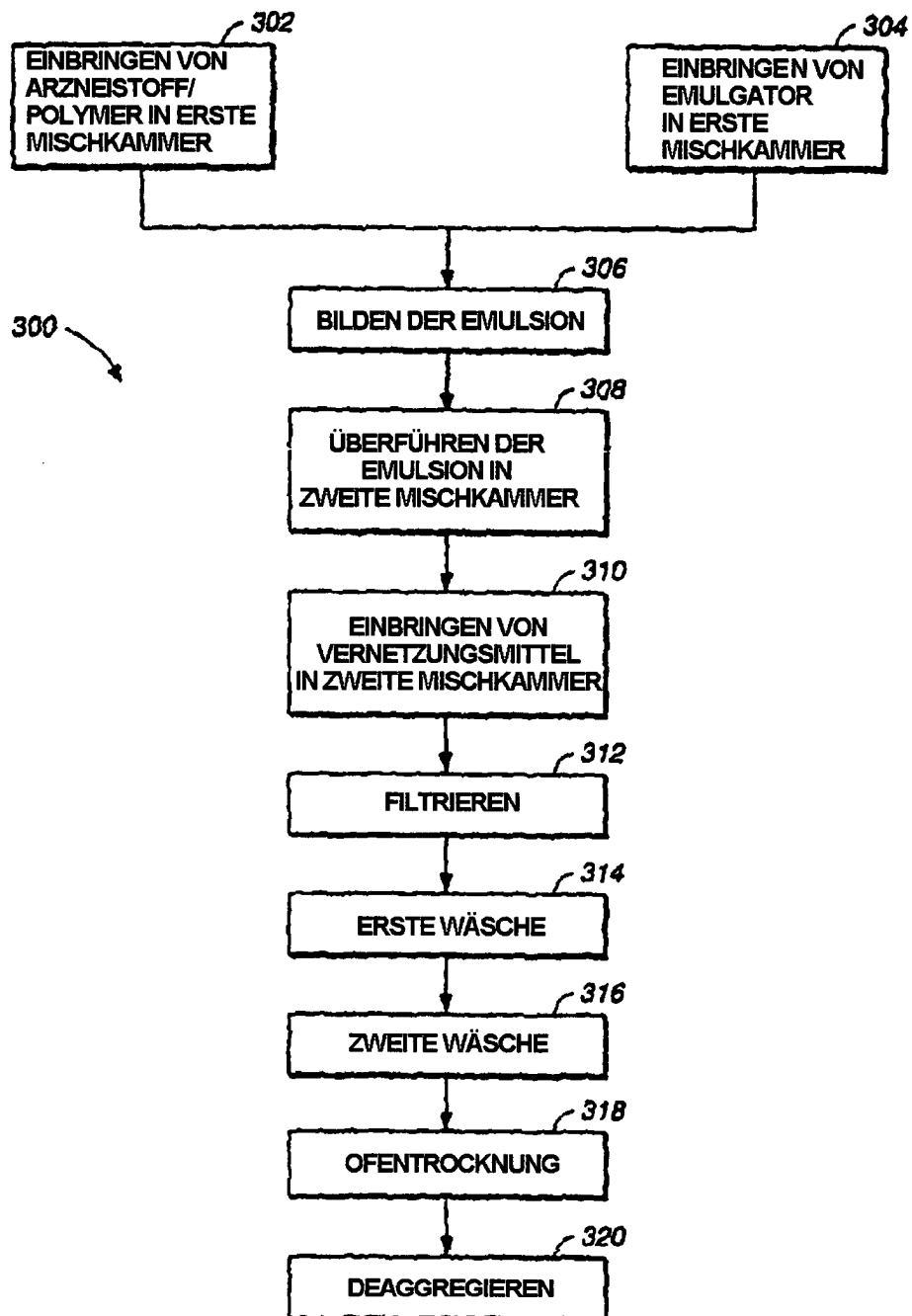
Es folgen 5 Blatt Zeichnungen







**FIG. 2**



**FIG. 3**

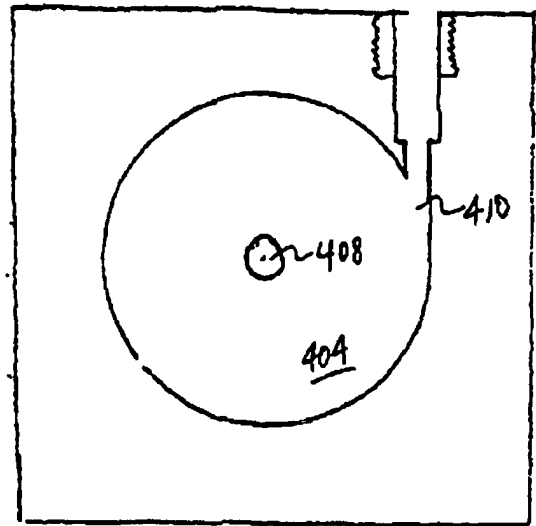


FIGURE 4C

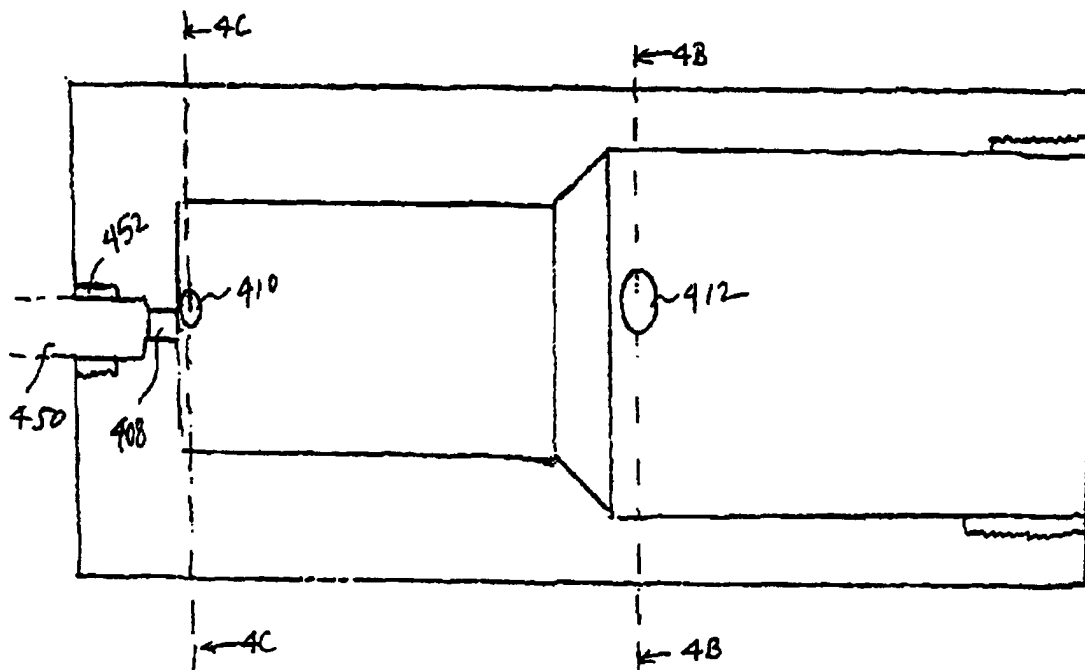


FIGURE 4A

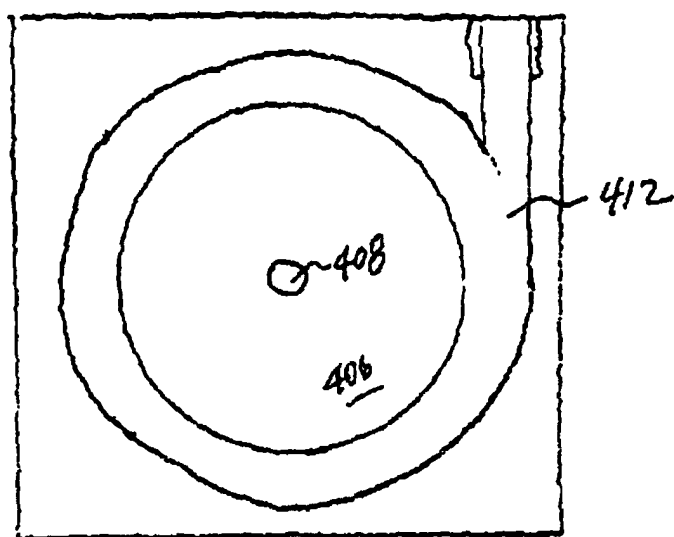


FIGURE 4B