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

(10) **DE 694 32 358 T2** 2004.02.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 740 528 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 32 358.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/13817**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 908 414.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/015118**
(86) PCT-Anmeldetag: **30.11.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **08.06.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.11.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **26.03.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.02.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 9/127**
A61K 9/50, A61K 7/00

(30) Unionspriorität:

159674	**30.11.1993**	**US**
159687	**30.11.1993**	**US**
160232	**30.11.1993**	**US**
307305	**16.09.1994**	**US**
346426	**29.11.1994**	**US**

(73) Patentinhaber:
Imarx Therapeutics, Inc., Tucson, Ariz., US

(74) Vertreter:
Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European Patent Attorneys, 81671 München

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

(72) Erfinder:
UNGER, Evan C., Tucson, US; MATSUNAGA, Terry, Tucson, US; YELLOWHAIR, David, Tucson, US

(54) Bezeichnung: **GASHALTIGE MIKROSPHÄREN ZUR TOPISCHEN UND SUBKUTANEN ANWENDUNG**

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

Technischer Hintergrund der Erfindung Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Verfahren und Zusammensetzungen zur topischen Verabreichung von Wirkstoffen, insbesondere Medikamenten und Kosmetika, zu einem ausgewählten Gewebe eines Patienten, insbesondere der Haut. Während die topische Verabreichung gewöhnlich und hauptsächlich die Verabreichung zur Haut eines Patienten darstellt, ist der hier in der Beschreibung der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff topisch nicht hierauf beschränkt, sondern umfasst die Verabreichung zu irgendwelchen und allen externen und inneren Gewebeoberflächen eines Patienten. Daher umfassen andere Orte der topischen Verabreichung zusätzlich zur Haut eines Patienten verschiedene Schleimhäute wie z. B. die Schleimhäute des Auges, der Nase, des Rektums und der Vagina. Ebenfalls ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung die topische Verabreichung zur Lunge, d. h. entweder einzeln oder kollektiv zu den Bronchien, den Bronchiolen und den Alveolen umfasst.

[0002] Während die Verabreichung zur gewünschten Gewebeoberfläche topisch erfolgt (d. h. lokal oder direkt an der Gewebeoberfläche), können Absorption und Transfer vom lokalen Ort der Verabreichung zu anderen Gebieten oder Bereichen des Patienten insbesondere systemisch über das Blut erfolgen. Somit kann, während die topische Verabreichung lokal erfolgt (z. B. direkt zur Lunge oder eines Teils davon), falls dies gewünscht wird, eine systemische Weiterbeförderung erfolgen, welche zur Zufuhr des Medikaments zu den verschiedenen anderen Bereichen des Körpers des Patienten führt. In bestimmten Situationen kann indessen eine systemische Weiterbeförderung nicht notwendig oder wünschenswert sein, wie z. B. im Falle von bestimmten Medikamenten zur Behandlung von Bronchitis oder Asthma, bei welchen eine topische Verabreichung zu den Schleimhäuten der Lunge alles ist, was erforderlich ist.

[0003] Die vorliegende Erfindung umfasst weiterhin im Rahmen der Bedeutung des Begriffs topisch die Anwendung der weiter unten beschriebenen Zusammensetzungen zu spezifischen Geweben eines Patienten, welche, obwohl sie unter gewöhnlichen Umständen vollständig im Inneren liegen und einer topischen Verabreichung nicht zugänglich sind, z. B. als Ergebnis einer Operation oder eines Traumas freigelegt werden können. Es läge somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen während des Verlaufs einer Operation am offenen Herzen auf die freigelegten Herzgewebe anzuwenden.

[0004] Die vorliegende Erfindung ist weiterhin auf die subkutane Verabreichung von Wirkstoffen gerichtet, d. h. auf die Verabreichung mittels Injektion unter die Oberfläche des Gewebes eines Patienten, insbesondere der Haut. Subkutane Injektionen erlauben die Bildung von Wirkstoffdepots (d. h. eines Reservoirs unterhalb der Oberfläche), welche eine nachhaltige Freisetzung des Wirkstoffs in das System des Patienten ermöglichen. Während es sich bei einer subkutanen Verabreichung gewöhnlich und hauptsächlich um die Verabreichung mittels Injektion unter die Haut eines Patienten handelt, ist der hier in der Beschreibung der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff subkutan nicht hierauf beschränkt, sondern umfasst die Verabreichung mittels Injektion unter irgendwelche und alle beliebigen externen oder internen Gewebeoberflächen eines Patienten. Somit umfassen andere Orte einer subkutanen Verabreichung zusätzlich zur Haut eines Patienten eine Verabreichung unter die Oberfläche des Auges oder der äußeren Herzmembran eines Patienten.

[0005] Auf diesem Gebiet besteht eine nachhaltiges Bedürfnis nach verbesserten Verfahren und Zusammensetzungen, da die topische und subkutane Verabreichung von Wirkstoffen, insbesondere therapeutischen Mitteln, zu einem gewünschten lokalen Wirkort oft bei höheren Konzentrationen erfolgen kann, als dies auf systemischen Wege ohne unerwünschte Nebenwirkungen möglich wäre. Weiterhin ist wohlbekannt, dass die meisten Medikamente und Kosmetika schlecht absorbiert werden oder sogar zunächst an der Hautoberfläche zurückgehalten werden, falls diese der Ort der topischen oder subkutanen Verabreichung ist. Im Falle von Medikamenten ist die Absorption durch die Hautoberfläche oder unterhalb der Hautoberfläche im Allgemeinen langsam und somit gewöhnlich ineffektiv. Im Fall von Kosmetika, insbesondere von Vitaminen und ihren Derivaten sowie von Sonnenschutzmitteln ist es schwierig zu verhindern, dass diese Verbindungen von der Haut abgewaschen werden; gleichennaßen ist es ähnlich schwierig, zu bewirken, dass diese Verbindungen in die Haut eindringen.

[0006] Topische und subkutane Zufuhr therapeutischer Mittel kann auch die systemische Verabreichung des in Frage kommenden Wirkstoffs zum Patienten zum Ziel haben, d. h. die Erhöhung der Plasmaspiegel des involvierten Medikaments bei einem Patienten, dem dieses verabreicht wird. Daher umfasst das Gebiet der vorliegenden Erfindung auch Verfahren und Zusammensetzungen zur Anwendung von Wirkstoffen zur Haut oder unter die Haut, um eine transdermale oder systemische Zufuhr des Wirkstoffs zu erreichen, d. h. Zuführen des Wirkstoffs in einer zur Absorption durch die Haut oder unterhalb der Haut in den Blutstrom geeigneten Form. Weiterhin liegt es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, die besagten Zusammensetzungen zu den Schleimhäuten und den anderen oben beschriebenen Geweben zu verabreichen, um eine transdermale oder systemische Verabreichung des involvierten Wirkstoffs zu erreichen.

Kurzdarstellung des Standes der Technik

[0007] Im Stand der Technik wurde eine große Vielzahl von topischen und subkutanen Zufuhrsystemen zur Zufuhr von Wirkstoffen wie z. B. Medikamenten und Kosmetika zu verschiedenen Geweben eines Patienten entwickelt, insbesondere mittels topischer Verabreichung zur Haut und durch die Haut hindurch. Zur Verbesserung des Eindringens von Medikamenten und Kosmetika in die Haut wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl von Techniken und Materialien erprobt. Diese umfassen Iontophorese und Ultraschall zur Verbesserung des Eindringens der Medikamente in die Haut, sowie die Verwendung von Zusammensetzungen, welche das Eindringen verbessernde Verbindungen, Tenside, Lipide und andere aliphatische Verbindungen, Liposomen und Niosomen enthalten. Obwohl alle diese Mittel in gewissem Umfang die Absorption der Medikamente und in einigen Fällen die Wirksamkeit der Kosmetika erhöht zu haben scheinen, wurde bisher noch nichts entwickelt, das die gewünschten optimalen Eigenschaften aufweist. Die bisher fortschrittlichsten Formulierungen zur Zufuhr von Medikamenten und Kosmetika zur Haut könnten die Liposomen oder Niosomen sein, aber auch diese Mittel weisen mehrere Nachteile auf. So war es beispielsweise schwierig, stabile, pharmazeutisch verträgliche Formulierungen zu entwickeln, welche von diesem Gebrauch machen, und die darin enthaltenen Wirkstoffe sowie die Lipidverbindungen oder aliphatischen Verbindungen, aus welchen sie hergestellt sind, können während der Lagerung oxidieren oder hydrolysieren oder sogar nach ihrer Anwendung an der Haut zersetzt werden.

[0008] Bisher wurden insbesondere mit Wasser gefüllte Liposomen zur Zufuhr von Medikamenten zur Haut verwendet. Liposomen sind Vesikel, welche aus einer oder mehreren konzentrischen Phospholipidschichten aufgebaut sind, welche gewöhnlich als uni-, oligo- und multilamellar bezeichnet werden, und typischerweise steht dann, wenn diese mit einer wässrigen Lösung des Wirkstoffs gefüllt sind, der Innenraum des Liposoms im Gleichgewicht mit dem Gas auf der Außenseite des Liposoms, so dass ein Sauerstoffaustausch durch die Liposomenmembran stattfindet. Dies führt zu einer oxidativen Zersetzung des Wirkstoffs, welcher darin verkapselt ist. Beispiele von Medikamenten, welche sauerstoffempfindlich sein können, sind die fettlöslichen Vitamine A, E, D und K sowie wasserlösliche Vitamine wie z. B. Vitamin C, auf Eisen(II) basierende Salze, Penam-, Cepham- und Monobactamantibiotika aufgrund von Hydrolyse, chemotherapeutische Wirkstoffe und dergleichen.

[0009] Im Stand der Technik wurde nicht erkannt, dass es möglich sein würde, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Liposomen und Schaum herzustellen, wie diese gemäß den spezifischen Verfahren der vorliegenden Erfindung hergestellt werden, und dass solche Mikrokügelchen und Schäume hinsichtlich der topischen Zufuhr verschiedener Wirkstoffe zur Haut signifikante Vorteile besitzen würden. Zwar ist die Schaumbildung während Verfahren nach dem Stand der Technik zur Herstellung von Liposomen und anderen Mikrovesikeln zufällig aufgetreten; aber auch hier wurde nicht erkannt, dass es möglich oder auch nur wünschenswert wäre, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte erfindungsgemäße Liposomen und daraus bestehenden Schaum als Vehikel zur topischen oder subkutanen Zufuhr von verschiedenen Wirkstoffen herzustellen.

[0010] So schlägt z. B. Ryan et al, US-Patent Nr. 4,900,540 mit dem Titel "Lipisomes (sic) Containing Gas for Ultrasound Detection" in Bezug auf Gas oder gasförmige Vorstufen enthaltende Liposomen lediglich vor, dass diese mittels Suspension in einer physiologisch verträglichen Flüssigkeit wie z. B. Salzlösung parenteral oder auf anderen Wegen verabreicht, zur Verwendung als diagnostisches Ultraschall-Kontrastmittel verwendet werden können; es wird indessen an keiner Stelle gesagt, dass dies Anwendungen wie die topische Verabreichung zur Haut umfasst.

[0011] Tickner et al., WO 80/02365 mit dem Titel "Ultrasonic Image Enhancement", stellen ein Verfahren zur Verbesserung der Ultraschallbilder des Blutstroms eines Patienten zur Verfügung, indem eine Vielzahl von Mikrobläschen durch den Blutstrom fließen gelassen wird, welche eine Oberflächenmembran wie z. B. Gelatine aufweisen, die eine Gas verkapselt. Es wir indessen bevorzugt, dass die Mikrobläschen in einem Medium gebildet und dispergiert werden, welches eine im wesentlichen mit der Membran identische chemische Zusammensetzungen aufweist und eine Gelbildung zulässt. Solche Zusammensetzung würden vermutlich nicht als Schäume geeignet sein; darüber hinaus ist klar, dass keine Intention bestand, diese Zusammensetzungen in irgendwelchen topischen oder subkutanen Anwendungen zu verwenden.

[0012] In einem Artikel von Szoka und Papahadjopoulos in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978) 4194–4198, mit dem Titel "Procedure for preparation of liposomes with a large aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation" wird die Beschallung eines Zweiphasensystems, gefolgt von der Verdampfung des Lösungsmittels beschrieben, während welcher eine Schaumbildung im System beobachtet wird. Im Anschluss daran erfolgt indessen die Bildung eines viskosen Gels und anschließend einer wässrigen Suspension, wonach nicht verkapseltes Material und restliches organisches Lösungsmittel entfernt werden. Die hergestellten Liposomen sind nicht mit Gas oder mit gasförmiger Vorstufe gefüllt, und darüber hinaus wird die Bildung von Mikrokügelchen oder Schaum zur topischen Verabreichung nicht vorgeschlagen. In ähnlicher Weise beschreiben Hug und Sleight, Biochimica et Biophysica Acta, 1097 (1991) 1–17 eine Umkehrphasen-Verdampfungsverkapselung, wobei von ihnen vorgeschlagen wird, die Beschallung durch eine heftige Verwirbelung zu erset-

zen.

[0013] Wie oben diskutiert wurde, werden hier indessen keine mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Liposomen hergestellt; es ist ein lediglich vorübergehender Zwischenschritt involviert, und das Endprodukt stellt keinen stabilen Schaum dar.

[0014] Cerny et al. beschreiben im US-Patent 4,957,656 mit dem Titel "Continuous Sonication Method for Preparing Protein Encapsulated Microbubbles" ein Ultraschall-Bildgebungsmittel, welches mittels kontinuierlicher Beschallungsbehandlung einer wässrigen Lösung eines Hitze-denaturierbaren biokompatiblen Proteins. hergestellt wird, während welcher ein gasförmiges Fluid, vorzugsweise Luft, zur Lösung zugeführt wird. Während der Beschallung wird die Luft enthaltende Lösung geschäumt, um die Bildung und Konzentration an Mikrobläschen zu erhöhen; ein derartiger Schaum wird indessen nicht als im Endprodukt wünschenswert angesehen, da ausgesagt wird, dass der Schaum anschließend einfach zum Verschwinden gebracht werden kann, sobald das Produkt aus der Beschallungskammer entnommen wurde.

[0015] Im Stand der Technik gibt es verschiedene Ansätze zur Überwindung der verschiedenen Faktoren, welche die Verwendung von Liposomen als praktische Träger von biologisch wirksamen Verbindungen beschränken, wie z. B. die begrenzte physikalische Stabilität wässriger Dispersionen von Liposomen. So beschreiben Payne et al. im US-Patent 4,830,858 ein Verfahren zur Herstellung eines stabilen Liposomenvorläufers in Form einer Mischung von sprühgetrockneten Liposomalkomponenten, welche im trockenen Zustand gelagert werden können und mit Wasser unmittelbar vor ihrer Verwendung zur Bildung eines Liposomenpräparats wiederhergestellt werden können. Es existiert indessen bis zum heutigen Tage kein Hinweis auf die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Erdeckung, d. h. dass Lipide und andere Verbindungen, welche im Folgenden genauer definiert werden, zur Formulierung von stabilen, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen und Schäumen mit verbesserten Eigenschaften für die Zufuhr von Pharmazeutika und andere Wirkstoffe zu Bereichen wie z. B. der Haut verwendet werden können.

[0016] Von D'Arrgio werden in den US-Patenten 4,684,479 und 5,215,680 Gas-in-Flüssigkeit-Emulsionen bzw. Lipid-beschichtete Mikrobläschen beschrieben, welche stabil sind und als auf verschiedenen Gebieten nützlich beschrieben werden, einschließlich als Kontrastmittel für die Echokardiographie zur Ultraschallüberwachung des lokalen Blutflusses. Es existiert indessen kein Hinweis darauf, dass diese Zusammensetzungen zur topischen oder subkutanen Zufuhr von Wirkstoffen nützlich sein würden.

[0017] Weiterhin beschreibt Vanderipe in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 93/06869 die Verwendung von Blasen aus Gas und Gasgemischen, einschließlich Perfluorkohlenwasserstoffen als Ultraschall-Bildverbesserungsmittel. Diese Gasblasen sind indessen nicht verkapselt und es existiert kein Hinweis auf ihre Verwendung zur topischen oder subkutanen Zufuhr von Wirkstoffen.

[0018] Lanza et al. beschreiben in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 93/20802 akustisch reflektierende oligolamellare Liposomen zur Ultraschall-Bildverbesserung, bei weichen es sich um muitilamellare Liposomen mit erhöhtem wässrigen Zwischenraum zwischen den Doppelschichten handelt, oder welche in den Doppelschichten in einer nichtkonzentrischen Art und Weise eingelagerte Liposomen aufweisen und somit intern getrennte Doppelschichten enthalten. Auch ihre Verwendung bei der Überwachung eines einem Patienten in Liposomen verabreichten Medikaments wird beschrieben. Indessen werden die erfindungsgemäßen stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen oder Schäume oder deren Verwendung in Anwendungen wie der z. B. topischen Zufuhr von Wirkstoffen nicht beschrieben.

[0019] Widder et al. beschreiben in der veröffentlichten europäischen Patentanmeldung EP-A-0 324 938 stabilisierte Ultraschall-Bildgebungsmittel vom Typ der Mikrobläschen, hergestellt aus einem Hitre-denaturierbaren biokompatiblen Protein wie z. B. Albumin, Hämoglobin oder Collagen. Indessen wird auch hier die Verwendung derartiger Zusammensetzungen für Anwendungen wie die topische Zufuhr von Wirkstoffen nicht beschrieben.

[0020] Weiterhin wird auch ein von Moseley et al. im Jahr 1991 beim Treffen der Society for Magnetic Resonance in Medicine in San Francisco, Kalifornien, gehaltener Vortrag erwähnt, welcher in einem Abstrakt mit dem Titel "Microbubbles: A Novel MR Susceptibility Contrast Agent" zusammengefasst ist. Die verwendeten Mikrobläschen umfassen Luft, welche mit einer Hülle aus Humanalbumin beschichtet ist. Indessen werden die stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten erfindungsgemäßen Mikrokügelchen und Schäume sowie ihre Verwendung für Anwendungen wie die topische Zufuhr von Wirkstoffen nicht vorgeschlagen.

[0021] Tei et al. beschreiben in der ungeprüften Patentanmeldung SHO 63-60943 Kontrastmittel für die Ultraschalldiagnose, welche eine Perfluorkohlenwasserstoffemulsion mit einer Emulsionsteilchengröße von 1–10 μm umfassen, bei welchen der Perfluorkohlenwasserstoff vorzugsweise 9–11 Kohlenstoffatome aufweist und der Emulgator z. B. ein Phospholipid oder ein nicht-ionisches polymeres Tensid sein kann wie zum Beispiel Poly(oxyethylen)-Poly(oxypropylen)-Copolymere. Die Emulsion kann unter Verwendung einer Mischvorrichtung hergestellt werden. Es existiert indessen kein Hinweis darauf, dass diese Perfluorkohlenwasserstoffemulsionen für Anwendungen wie die topische Zufuhr von Wirkstoffen geeignet wären.

[0022] Knight et al. beschreiben im US-Patent 5,049,388 ein Aerosol mit geringer Teilchengröße aus Liposomen bzw. Liposomen/Medikamenten-Kombinationen zur medizinischen Verwendung, wie z. B. der Medika-

mentenzufuhr zu den Atemwegen mittels Inhalation. Es existiert indessen kein Hinweis darauf, dass dies Liposomen mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllt sein können; sie sind daher von den erfindungsgemäßen stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen und Schäumen unterscheidbar.

[0023] WO 92/22298 beschreibt Medikamente enthaltende, mit Gas gefüllte Liposomen, Verfahren und Vorrichtungen zur Herstellung solcher Liposomen sowie Verfahren zum Einsatz solcher Liposomen als Medikamentenzufuhrsysteme. In diesen Liposomen können verschiedene biokompatible Gase verwendet werden, einschließlich Gasen wie Luft, Stickstoff, Kohlendioxid, Sauerstoff, Argon, Xenon, Helium sowie allen Kombinationen daraus.

[0024] DE-A-2521003 beschreibt Cremes und Salben, welche medizinisch oder kosmetisch wirksame Substanzen enthalten und welche weiterhin hohle Mikrokügelchen enthalten. Diese Mikrokügelchen weisen dünne, aus einem thermoplastischen Material gebildete Hüllen auf, welche entweder hohl oder mit Luft gefüllt sind. Es existiert kein Hinweis darauf, dass diese Mikrokügelchen selbst eine medizinisch oder kosmetisch wirksame Substanz enthalten oder als Vehikel für diese dienen.

[0025] US-Patent Nr. 4,466,442 beschreibt Ultraschall-Kontrastmittel, umfassend eine Lösung, enthaltend Mikrobläschen eines Gases wie z. B. steriler Luft, Kohlendioxid, Sauerstoff, Stickstoff, Edelgasen oder Mischungen daraus, ein Tensid und eine viskositätssteigernde Verbindung. Es existiert kein Hinweis darauf, dass die in dieser Entgegenhaltung beschriebene Zusammensetzung irgendwelche Wirkstoffe wie z. B. therapeutische Mittel oder Kosmetika enthält oder dass die Zusammensetzungen in irgendeiner Weise für die Zufuhr derartiger Wirkstoffe nützlich wären.

[0026] WO 94/28873, welche Stand der Technik gemäß Artikel 54(3) EPÜ darstellt, beschreibt mit Gas gefüllte Mikrokügelchen als beispielsweise in therapeutischen Medikamentenzufuhrsystemen für die wirkort-spezifische Zufuhr von Therapeutika nützlich. In den Mikrokügelchen können verschiedene biokompatible Gase eingesetzt werden, einschließlich von Gasen wie Luft, Stickstoff, Kohlendioxid, Sauerstoff, Argon, Fluor, Xenon, Helium und irgendwelchen Kombinationen davon.

[0027] EP-A-0614656, welche Stand der Technik gemäß Artikel 54(3) EPÜ darstellt, beschreibt Kosmetika oder dermatopharmazeutische Zusammensetzungen in Form von wässrigen Gels, welche mittels Zusatz von expandierten thermoplastischen Mikrokügelchen modifiziert sind. Wie in der oben beschriebenen DE-A-2521003 wird angegeben, dass die Mikrokügelchen mit Gas gefüllt sind, z. B. mit Luft, Isobutan oder Isopentan, aber es wird sehr deutlich angezeigt, dass die Mikrokügelchen hohl sind und keinen Wirkstoff verkapseln.

[0028] WO-A-9400110, welche Stand der Technik gemäß Artikel 54(3) EPÜ darstellt, beschreibt Zusammensetzungen zur Anwendung an der Haut, welche "asymmetrische lamellare Aggregate" enthalten, welche aus Phospholipiden, pharmazeutisch wirksamen Substanzen und Fluorkohlenwasserstoffen bestehen. Bevorzugte Fluorkohlenwasserstoffe umfassen Perfluordecalin, F-Butyltetrahydrofuran, Perfluortributylamin, Perfluoroctylbromid, bis-Fluor(butyl)ethan, bis-Fluor(hexyl)ethan oder C_6-C_9-Perfluoralkane. Diese Entgegenhaltung verdeutlicht, dass die Aggregate keine Vesikel wie z. B. Liposomen sind.

[0029] US-Patent Nr. 5,310,540 ist auf Verfahren zur Herstellung von mit Gas gefüllten Protein-Mikrokügelchen für die Ultraschall-Echographie und andere medizinische Anwendungen gerichtet. Es existiert kein Hinweis darauf, dass diese Protein-Mikrokügelchen irgendwelche Wirkstoffe wie z. B. therapeutische Wirkstoffe enthalten. Geeignete Gase umfassen Stickstoff, Argon und andere Edelgase, Stickstoff(I)oxid, Kohlenwasserstoffdämpfe und Methan.

KURZDARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0030] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Zusammensetzung zur topischen oder subkutanen Anwendung an einem ausgewählten Gewebe eines Patienten zur Verfügung gestellt, umfassend einen Schaum, welcher mit Gas oder mit temperaturaktivierter gasförmiger Vorstufe gefüllte Liposomen umfast, wobei die Liposomen ein therapeutisches oder kosmetisches Mittel, darin eingeschlossen oder damit verknüpft, aufweisen und das Gas oder die temperaturaktivierte gasförmige Vorstufe einen Perfluorkohlenwasserstoff, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Tetrafluormethan, Hexafluorethan, Octafluorpropan, Decafluorbutan, Dodecafluorpentan, Hexafluorcyclopropan, Octafluorcyclobutan und Decafluorcyclopentan, umfasst.

[0031] Die in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen vorhandenen Liposomen werden im Folgenden auch als Mikrokügelchen bezeichnet.

[0032] Die Wirkstoffe umfassen Medikamente, insbesondere Peptide und andere bioaktive Verbindungen sowie Kosmetika. Das in den Liposomen eingeschlossene Gas kann zur Verhinderung der Oxidation und weiterer Formen der Zersetzung labiler Medikamente, bioaktiver Verbindungen und Kosmetika dienen. Das Gas kann z. B. Perfluorpropan sein. Die Liposomen können z. B. aus einem biokompatiblen Lipid oder Polymer gebildet sein. Das Lipid kann in Form einer Monoschicht oder Doppelschicht vorliegen, und die Mono- oder Doppelschicht-Lipide können zur Bildung einer Reihe von konzentrischen Mono- oder Doppelschichten verwendet werden. Somit kann das Lipid in Form eines unilamellaren Liposoms (bestehend aus einem Monoschicht- oder

Doppelschicht-Lipid), eines oligolamellaren Liposoms (bestehend aus zwei oder drei Monoschicht- oder Doppelschicht-Lipiden) oder eines multilamellaren Liposoms (bestehend aus mehr als drei Mono- oder Doppelschicht-Lipiden) verwendet werden. Das biokompatible Lipid ist vorzugsweise ein Phospholipid. Die resultierende, mit Gas oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen-Zusammensetzung, welche die Form eines Schaums annimmt, weist eine sehr cremige Textur und die Hautdurchdringung verbessernde Qualitäten zur topischen oder subkutanen Zufuhr von Wirkstoffen wie z. B. Pharmazeutika und Kosmetika auf.

[0033] Ein Verfahren zur Herstellung der mit Gas und/oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllten, auf Lipid basierenden Mikrokügelchen, welche einen Wirkstoff zur topischen oder subkutanen Anwendung an einem ausgewählten Gewebe eines Patienten umfassen, umfasst den Schritt des Schüttelns bzw. Rührens einer wässrigen Suspension des biokompatiblen Lipids (d. h. der stabilisierenden Lipid-Verbindung) in Gegenwart eines Gases und/oder einer gasförmigen Vorstufe, was zu den mit Gas und/oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen führt. Der Schritt des Rührens wird in wünschenswerter Weise bei einer Temperatur unterhalb der Gel/Flüssigkristall-Phasenübergangstemperatur des Lipids durchgeführt, um ein bevorzugtes Endprodukt zu erhalten. Der Wirkstoff kann zur wässrigen Suspension vor dem Rühren oder nach dem Rühren zugegeben werden; in beiden Fällen wird der Wirkstoff mit den mit Gas oder der gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen assoziiert sein.

[0034] Wenn eine gasförmige Vorstufe verwendet wird, wird die mit der gasförmigen Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen-Zusammensetzung allgemein bis zur Verabreichung an einen Patienten bei einer Temperatur gehalten, bei welcher die gasförmige Vorstufe flüssig ist. Zum Zeitpunkt der Verabreichung kann die Temperatur, falls erwünscht, erhöht werden, um die gasförmige Vorstufe zur Bildung eines Gases zu aktivieren, und das resultierende, mit Gas gefüllte Mikrokügelchen kann anschließend beim Patienten topisch oder subkutan angewandt werden. Alternativ können die mit der gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, falls erwünscht, ohne Temperaturerhöhung angewandt werden, und der gasförmigen Vorstufe wird es ermöglicht, als Ergebnis der Temperatur der Gewebeoberfläche des Patienten (z.B. der Haut des Patienten) ein Gas zu bilden. Die Zusammensetzung kann, falls erforderlich, vor der Verabreichung geschüttelt werden.

[0035] Weiterhin wird erfindungsgemäß die Verwendung von Zusammensetzungen gemäß Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur topischen oder subkutanen Zufuhr eines Wirkstoffs zu einem ausgewählten Gewebe eines Patienten zur Verfügung gestellt, welches den Schritt umfasst, dass an dem besagten Gewebe des Patienten topisch oder subkutan mit Gas/und oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen angewendet werden, wobei die Mikrokügelchen weiterhin eine wirksame Menge des besagten Wirkstoffs umfassen. Die Wirkstoffe umfassen Medikamente, insbesondere Peptide und andere bioaktive Verbindungen, sowie Kosmetika.

KURZDARSTELLUNG DER ZEICHNUNGEN

[0036] **Fig.** 1 zeigt eine graphische Darstellung der subkutanen Zufuhr der erfindungsgemäßen mit Gas gefüllten Mikrokügelchen und Wirkstoffe zur Haut eines Patienten. **Fig.** 1B zeigt eine vergrößerte Ansicht des in **Fig.** 1A mit einem Kreis markierten Gebiets.

[0037] **Fig.** 2 zeigt eine graphische Abbildung der topischen Zufuhr der erfindungsgemäßen mit Gas gefüllten Mikrokügelchen und Wirkstoffe zur Lunge eines Patienten mittels Inhalation im Vergleich mit der Zufuhr von vielen herkömmlichen Mikrokügelchen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0038] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen gemäß Anspruch 1,. umfassend mit Gas und/oder gasförmigen Vorstufen gefüllter Mikrokügelchen sowie deren Verwendung als Vehikel zur topischen und subkutanen Verabreichung. Die Mikrokügelchen bestehen aus biokompatiblen Lipiden und/oder Polymeren, welche eine Haut bzw. Membran bilden, die das Gas oder die gasförmige Vorstufe verkapselt bzw. umgibt (d. h. einen Hohlraum bzw. Leerraum darum ausbildet). Die Lipide und/oder Polymere verleihen dem Mikrokügelchen strukturelle Festigkeit und ermöglichen seine funktionale Dauerhaftigkeit während einer nützlichen Zeitdauer. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen, wobei die Mikrokügelchen weiterhin eine wirksame Menge eines Wirkstoffs zur topischen oder subkutanen Anwendung an einem ausgewählten Gewebe eines menschlichen oder tierischen Patienten, bei welchen die Mikrokügelchen angewendet werden, umfassen. Die resultierende Mikrokügelchen-Zusammensetzung nimmt oft die sichtbare Form eines Schaums an, welcher eine Matrix (Aggregat oder Konglomerat) von Mikrokügelchen in einem flüssigen Medium darstellt, und als solcher hier als Schaum oder stabilisierter Schaum bezeichnet wird. Falls erwünscht können die den Schaum bildenden Mikrokügelchen unter Verwendung irgendeines einer Vielzahl von dem Fachmann wohlbekannten Mitteln dispergiert oder getrennt werden. Vorzugsweise werden die Mikrokügelchen indessen in Form eines Schaums verabreicht.

[0039] Die nützlichsten stabilisierenden Verbindungen zur Verwendung bei der Herstellung der Wand der Mi-

krokügelchen sind typischerweise solche, welche eine hydrophobe/hydrophile Eigenschaft aufweisen, welche es ihnen gestattet, in Gegenwart eines auf Wasser basierenden Mediums Doppelschichten und somit Mikrokügelchen zu bilden. Somit kann Wasser, Salzlösung oder irgendein anderes, auf Wasser basierendes Medium, welches im Folgenden oft als Verdünnungsmittel bezeichnet wird, einen Aspekt der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten erfindungsgemäßen Mikrokügelchen darstellen, wenn solche doppelschichtenbildende Zusammensetzungen als stabilisierende Verbindungen verwendet werden.

[0040] Die Stabilität der resultierenden erfindungsgemäßen Mikrokügelchen und des Schaums ist zumindest teilweise auf die Materialen, aus welchen sie hergestellt sind, zurückzuführen. Die stabilisierende Verbindung kann tatsächlich ein Gemisch von Verbindungen darstellen, welches verschiedene wünschenswerte Eigenschaften zu den Mikrokügelchen und dem Schaum beitragen. So haben sich beispielsweise Verbindungen, welche zur Auflösung oder Dispergierung der grundlegenden stabilisierenden Verbindung beitragen, als vorteilhaft herausgestellt. Es ist nicht erforderlich, stabilisierende Hilfsstoffe als Additive einzusetzen, obwohl dies natürlich wahlweise erfolgen kann und die Auswahl solcher stabilisierenden Hilfsstoffe im Können des durch die Beschreibung der hier enthaltenen vorliegenden Erfindung instruierten Fachmanns liegt. Die Materialen, aus welchen die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen und der Schaum aufgebaut sind, werden hier allgemein als stabilisierende Verbindungen bezeichnet; dies können z. B. biokompatible Lipid- und Polymermaterialien sein, obwohl auch andere Materialien, welche im Folgenden detailliert beschrieben werden, verwendet werden können, ebenso wie einige Materialien, welche entweder als grundlegende stabilisierende Verbindungen oder als stabilisierende Hilfsstoffe fungieren können: Wie hier angegeben ist, können die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen ein Gas wie z. B. Perfluorpropan verkapseln, welches bei Temperaturen deutlich oberhalb sowie deutlich unterhalb der Raumtemperatur gasförmig ist, oder die Mikrokügelchen können gasförmige Vorstufen wie z. B. Perfluoroctylbromid verkapseln, welche bei Raumtemperatur flüssig sind, aber bei Körpertemperatur eines Patienten, welchem sie verabreicht werden, unter Bildung eines Gases expandieren.

[0041] Darüber hinaus ist es möglich, ein Gas und eine gasförmige Vorstufe gemeinsam einzusetzen. Eine einzigartige Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beruht in der Tat auf der Entdeckung, dass eine gasförmige Perfluorkohlenwasserstoff-Vorstufe in Kombination mit einem Gas zur Herstellung der stabilisierten erfindungsgemäßen Mikrokügelchen diesen ein zusätzliches Ausmaß an Stabilität verleiht, welches ansonsten mit dem Gas alleine nicht erreicht werden kann. Es können auch Kombinationen von Gasen und Kombinationen von gasförmigen Vorstufen eingesetzt werden, um ein zusätzliches Ausmaß an Stabilität zu verleihen.

[0042] Diese mit gasförmigen Vorstufen hergestellten Mikrokügelchen und der Schaum weisen verschiedne Vorteile auf. Da die aus temperaturempfindlichen gasförmigen Vorstufen generierten Gase dazu tendieren, unlöslich und relativ undiffundierbar zu sein, können diese Gase zunächst leichter zur Verwendung als topische oder subkutane Zufuhrvehikel stabilisiert werden. Da diese Gase relativ stabil sind, ist eine geringere Menge an Stabilisierungsverbindungen notwendig, als dies im Falle löslicherer und diffundierbarerer Gase wie z. B. Stickstoff oder Luft erforderlich wäre. Im Allgemeinen ist zur Stabilisierung von Gasen wie Luft oder Stickstoff eine dickwandigere, weniger gaspermeable oder diffundierbare Haut bzw. Membran aus Stabilisierungsverbindung, d. h. ein dickwandiges Mikrokügelchen, erforderlich. Obwohl dickwandige, mit Luft, Stickstoff oder anderen Gasen gefüllte Mikrokügelchen als topische oder subkutane Zufuhrvehikel für verschiedene Wirkstoffe verwendet werden können, können die dicken Wände dieser Mikrokügelchen die Wirksamkeit der Mikrokügelchen und der Schaumzusammensetzungen einschränken. Mit den erfindungsgemäß verwendeten gasförmigen Vorstufen, vor allem den gasförmigen Perfluorkohlenwasserstoff-Vorstufen, können die stabilisierenden Verbindungen weniger starr sein und die resultierenden Mikrokügelchen dünnwandiger und einfacher anwendbar sein, und besitzen trotzdem immer noch genügende Mengen an stabilisierender Verbindung zur Stabilisierung des Gases.

[0043] Erfindungsgemäß werden Mikrokügelchen und Schaum sowie ein Verfahren zur Verwendung solcher Mikrokügelchen und des Schaums zur topischen oder subkutanen Zufuhr irgendeines oder mehrerer einer Vielzahl von Wirkstoffen zu einem ausgewählten Gewebe eines Patienten zur Verfügung gestellt. Es wird indessen ebenso in Erwägung gezogen, dass die Mikrokügelchen und der Schaum an sich in der Lage sind, die Rolle von Wirkstoffen zu spielen, insbesondere im Falle von kosmetischen Mitteln, und derartige Eigenschaften aufweisen. So kann es beispielsweise möglich sein, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen und Schaum an sich zu verwenden, um einem ausgewählten Gewebe Gleiteigenschaften oder Befeuchtungseigenschaften zu verleihen, natürlich vorausgesetzt, dass die Lipidzusammensetzung im Hinblick auf die Erzielung solcher Eigenschaften im Endprodukt ausgewählt wird. Die Auswahl der stabilisierenden Verbindung für solche Zwecke liegt im Können des Fachmanns, welcher sowohl mit den gewünschten Eigenschaften als auch mit der Vielzahl von Eigenschaften der zur Herstellung der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung existierenden stabilisierenden Verbindungen vertraut ist.

Eingesetzte Gase und gasförmige Vorstufen

[0044] Die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen verkapseln ein Gas und/oder eine gasförmige Vorstufe. Der

Begriff "mit Gas und/oder mit einer gasförmigen Vorstufe gefüllt", welcher hier verwendet wird, bedeutet, dass die Mikrokügelchen, auf welche sich die vorliegende Erfindung bezieht, ein inneres Volumen aufweisen, welches zu mindestens etwa 10% aus einem Gas oder einer gasförmigen Vorstufe besteht, vorzugsweise zu mindestens etwa 25% aus einem Gas oder einer gasförmigen Vorstufe besteht, noch weiter bevorzugt zu mindestens etwa 50% aus einem Gas oder einer gasförmigen Vorstufe besteht, weiter bevorzugt zu mindestens etwas 75% aus einem Gas oder einer gasförmigen Vorstufe besteht und am bevorzugtesten zu mindestens etwa 90% aus einem Gas oder einer gasförmigen Vorstufe besteht.

[0045] Erfindungsgemäß umfasst das in den Liposomen vorliegende Gas oder die temperaturaktivierte gasförmige Vorstufe einen Perfluorkohlenwasserstoff, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Tetrafluorrnethan, Hexafluorethan, Octafluorpropan, Decafluorbutan, Dodecafluorpentan, Hexafluorcyclopropan, Octafluorcyclobutan und Decafluorcyclopentan.

[0046] Perfluorkohlenwasserstoffe sind weniger diffundierbar und relativ unlöslich und können als solche leichter in Form von Bläschen in wässrigen Medien stabilisiert werden.

[0047] Die Verwendung von gasförmigen Vorstufen stellt eine optionale Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar. Insbesondere Perfluorkohlenwasserstoffe haben sich als zur Verwendung als gasförmige Vorstufen geeignet herausgestellt. Der Fachmann wird einsehen, dass ein gegebener Perfluorkohlenwasserstoff als gasförmige Vorstufe verwendet werden kann, d. h. im flüssigen Zustand, wenn die erfindungsgemäß verwendeten Mikrokügelchen zuerst hergestellt werden, oder direkt als Gas verwendet werden kann, d. h. im gasförmigen Zustand, um mit Gas und gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen herzustellen. Ob ein derartiger Perfluorkohlenwasserstoff ein Gas oder eine Flüssigkeit ist, hängt natürlich von dessen Flüssig/Gas-Phasenübergangstemperatur bzw. Siedepunkt ab. So ist beispielsweise einer der besonders bevorzugten Perfluorkohlenwasserstoffe das Perfluorpentan, welches eine Flüssig/Gas-Phasenübergangstemperatur bzw. einen Siedepunkt von 27°C aufweist, was bedeutet, dass dieses bei gewöhnlicher Raumtemperatur flüssig ist, aber in der Umgebung innerhalb des menschlichen Körpers, wo die Temperatur oberhalb seiner Flüssig/Gas-Übergangstemperatur bzw. seines Siedepunktes liegt, zum Gas wird. Somit ist Perfluorpentan unter gewöhnlichen Bedingungen eine gasförmige Vorstufe. Als weitere Beispiele gibt es Perfluorbutan und Perfluorhexan, die nächsten Homologen des Perfluorpentans. Die Flüssig/Gas-Phasenübergangstemperatur des Perfluorbutans beträgt 4°C und diejenige von Perfluorhexan beträgt 57°C, was die erstgenannte Verbindung zu einer möglichen gasförmigen Vorstufe macht, die aber vermutlich als Gas nützlicher ist, während die letztgenannte Verbindung eine gasförmige Vorstufe sein müsste, indessen aufgrund ihres hohen Siedepunktes unter ungewöhnlichen Umständen.

[0048] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Perfluorkohlenwasserstoffs, welcher bei der Temperatur der Verwendung der erfindungsgemäßen Mikrokügelchen im flüssigen Zustand vorliegt, um der Stabilität der mit Gas und einer gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen zu dienen oder diese zu verbessern. Solche Perfluorkohlenwasserstoffe, welche als zusätzliche Stabilisierungsmittel nützlich sind, umfassen Perfluoroctylbromid (PFOB), Perfluordecalin, Perfluordodecalin, Perfluoroctyliodid, Perfluortripropylamin und Perfluortributylamin. Im Allgemeinen werden Perfluorkohlenwasserstoffe mit einer Länge von mehr als sechs Kohlenstoffatomen bei der normalen menschlichen Körpertemperatur nicht gasförmig sein, d. h. im Gaszustand vorliegen, sondern eher Flüssigkeiten sein, d. h. im flüssigen Zustand vorliegen. Diese Verbindungen können indessen zusätzlich bei der Herstellung von stabilisierten, mit Gas oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllten, erfindungsgemäß verwendeten Mikrokügelchen verwendet werden. Dieser Perfluorkohlenwasserstoff ist vorzugsweise Perfluorhexan, welches bei Raumtemperatur im flüssigen Zustand vorliegt. Das anwesende Gas kann z. B. Luft oder Stickstoff sein, oder kann von einer gasförmigen Vorstufe abgeleitet sein, welche ebenfalls ein Perfluorkohlenwasserstoff wie z. B. Perfluorpentan sein kann. In diesem Falle würden die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen aus einem Gemisch von Perfluorkohlenwasserstoffen hergestellt werden, welches im vorliegenden Beispiel aus Perfluorpentan und Perfluorhexan bestehen würde. Es wir theoretisch vermutet, dass der flüssige Perfluorkohlenwasserstoff an der Zwischenfläche zwischen dem Gas und der Membranoberfläche des Mikrokügelchens angeordnet ist. Dort wird somit eine stabilisierende Schicht eines Perfluorkohlenwasserstoffs auf der Oberfläche von z. B. einem zur Bildung des Mikrokügelchens verwendeten biokompatiblen Lipids gebildet, und diese Perfluorkohlenwasserstoff-Schicht dient auch dem Zweck der Verhinderung einer Gasdiffusion durch die Membranen des Mikrokügelchens. Im Umfeld der vorliegenden Erfindung ist eine gasförmige Vorstufe bei der Herstellungs- und/oder Lagerungstemperatur eine Flüssigkeit, sie wird aber zumindest zum Zeitpunkt der Verwendung oder während der Verwendung ein Gas.

[0049] Es wurde somit entdeckt, dass ein flüssiger Perfluorkohlenwasserstoff, wenn dieser mit einem üblicherweise zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mikrokügelchen verwendeten Gase kombiniert wird, ein zusätzliches Ausmaß an Stabilität beitragen kann, welches ansonsten mit dem Gas allein nicht erreichbar ist. Es liegt somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, eine gasförmige Perfluorkohlenwasserstoff-Vorstufe wie z. B. Perfluorpentan zusammen mit einem Perfluorkohlenwasserstoff zu verwenden, welcher nach Verabreichung an einen Patienten flüssig bleibt, d.h. dessen Flüssig/Gas-Phasenübergangstemperatur oberhalb der Körpertemperatur des Patienten liegt.

[0050] Es kann irgendein biokompatibles Gas oder eine biokompatible gasförmige Vorstufe zur Bildung der stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen verwendet werden. Unter "biokompatibel" wird ein Gas oder eine gasförmige Vorstufe verstanden, welche nach Einführung in die Gewebe eines menschlichen Patienten in keiner Weise zu einer nicht akzeptablen Toxizität führen, einschließlich allergischer Reaktionen und Krankheitszuständen, und die vorzugsweise inert sind. Ein derartiges Gas oder eine gasförmige Vorstufe sollte auch zur Herstellung der hier beschriebenen, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen und Schaum, welche als topische oder subkutane Zufuhrmittel verwendbar sind, geeignet sein. Bevorzugte biokompatible Gase sind Luft, Argon, Helium, Stickstoff, Xenon und Neon. Das bevorzugteste Gas ist Luft. Zusätzlich können auch paramagnetische Gase oder Gase wie z. B. ^{17}O verwendet werden.

[0051] Die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen werden stabilisiert, wenn die hier beschriebenen stabilisierenden Verbindungen eingesetzt werden; anschließend kann die Größe der Mikrokügelchen für eine bestimmte, beabsichtigte topische oder subkutane End-Anwendung eingestellt werden, obwohl diese häufig nicht kritisch ist. In jedem Fall kann die Größe der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, falls erwünscht, mit einer Vielzahl von Verfahren eingestellt werden, einschließlich Mikroemulgierung, Verwirbelung, Extrusion, Filtration, Beschallung, Homogenisierung, wiederholte Gefrier- und Auftauzyklen, Druckextrusion durch Poren definierter Größe sowie mit ähnlichen Verfahren.

[0052] Wie oben erwähnt wurde, können die Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung im Hinblick auf deren Herstellung, auch die Bildung und Verwendung gasförmige Vorstufen umfassen, welche durch Temperatur aktiviert werden können. Weiter unten ist eine Tabelle angegeben, welche eine Reihe von gasförmigen Vorstufen aufführt, welche Phasenübergänge von flüssigen zu gasförmigen Zuständen nahe bei der normalen Körpertemperatur (37°C) eingehen, sowie die Größe der emulgierten Tröpfchen, welche zur Bildung eines Mikrobläschens einer maximalen Größe von 10 Mikron erforderlich wären.

[0053]

TABELLE 1
Physikalische Eigenschaften von gasförmigen Vorstufen sowie der Durchmesser eines emulgierten Tröpfchens zur Bildung eines 10 µm Mikrokügelchens *

Verbindung	Molekulargewicht	Siedepunkt (°C)	Dichte	Durchmesser (µm) eines emulgierten Tröpfchens zur Bildung eines 10 Mikron Mikrokügelchens
Perfluorpentan	288,04	27,73	1,7326	2,9
1-Fluorbutan +	76,11	32,5	6,7789	1,2
2-Methyl-butan (Isopentan) +	72,15	27,8	0,6201	2,6
2-Methyl-1-buten +	70,13	31,2	0,6504	2,5
2-Methyl-2-buten +	70,13	38,6	0,6623	2,5
1-Buten-3-in-2-methyl +	66,10	34,0	0,6801	2,4
3-Methyl-1-butin +	68,12	29,5	0,6660	2,5
Octafluorcyclobutan	200,04	-5,8	1,48	2,8
Decafluorbutan	238,04	-2	1,517	3,0
Hexafluorethan	138,01	-78,1	1,607	2,7

+ Referenzbeispiel

* Quelle: Chemical Rubber Company Handbook of Chemistry and Physics, Robert C. Weast and David R. Lide, Hrsg., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1989-1990).

[0054] Weiterhin wird im Folgenden eine Liste von möglichen gasförmigen Vorstufen angegeben, welche zur Bildung von Mikrokügelchen einer definierten Größe verwendet werden können. Diese Liste soll indessen nicht abschließend verstanden werden, da es möglich ist, andere gasförmige Vorstufen für diesen Zweck einzusetzen.

[0055] Geeignete gasförmige Vorstufen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind die folgenden: Hexafluoraceton, Tetrafluorallen, Hexafluor-1,3-butadien, Decafluorbutan, Perfluor-1-buten, Perfluor-2-buten, 2-Chlor-1,1,1,4,4,4-hexafluorbutin, Perfluor-2-butin, Octafluor-cyclobutan, Perfluorcyclobuten, Octafluorcyclopenten, Hexafluordimethylamin, Perfluorhexan, Norbornan, Perfluordimethylamin, 1,1,2-Trichlor-1,2,2-trifluorethan, 1,1-Dichlor-1,2,2,2-tetrafluorethan, 1-Chlor-1,1,2,2,2-pentafluorethan, Chlorpentafluorethan, Hexafluorethan, Nitropentafluorethan, Nitrosopentafluorethan, Perfluorethylamin, Trifluormethansulfonylchlorid, Trifluormethansulfonylfluorid, Bromdifluornitrosomethan, Bromtrifluormethan, Chlordifluornitromethan, Chlortrifluormethan, Dibromdifluormethan, Dichlordifluormethan, Idotrifluormethan, Nitrotrifluormethan, Nitrosotrifluormethan, Tetrafluorrnethan, Trichlorfluormethan, Perfluorpentan, Perfluorpent-1-en, Heptafluor-1-nitrosopropan, Perfluorpropan, 1,1,1,2,3,3-Hexafluor-2,3-dichlorpropan, Schwefelhexafluorid und Trifluoracetonitril.

[0056] Die Perfluorkohlenwasserstoffe sind, wie bereits angegeben wurde, bevorzugte Zusammensetzungen

zur Verwendung als die gasförmigen Vorstufen sowie als zusätzliche stabilisierende Komponenten. In diesen Perfluorkohlenwasserstoff-Zusammensetzungen umfasst sind gesättigte Perfluorkohlenwasserstoffe, ungesättigte Perfluorkohlenwasserstoffe sowie cyclische Perfluorkohlenwasserstoffe. Die gesättigten Perfluorkohlenwasserstoffe, welche üblicherweise bevorzugt werden, weisen die Formel C_nF_{2n+2} auf, wobei n von 1 bis 12, vorzugsweise 2 bis 10, weiter bevorzugt 4 bis 8 und besonders bevorzugt 5 ist. Beispiele geeigneter gesättigter Perfluorkohlenwasserstoffe sind die folgenden: Tetrafluormethan, Hexafluorethan, Octafluorpropan, Decafluorbutan, Dodecafluorpentan, Perfluorhexan und Perfluorheptan. Cyclische Perfluorkohlenwasserstofte, welche die Formel C_nF_{2n} aufweisen, wobei n von 3 bis 8, vorzugsweise 3 bis 6, ist, können ebenso bevorzugt werden und umfassen z. B. Hexafluorcyclopropan, Octafluorcyclobutan und Decafluorcyclopentan.

[0057] Es stellt einen Teil der vorliegenden Erfindung dar, die Nützlichkeit der Mikrokügelchen unter Verwendung von Gasen beschränkter Löslichkeit zu optimieren. Unter beschränkter Löslichkeit wird die Fähigkeit des Gases verstanden, aus den Mikrokügelchen aufgrund seiner Löslichkeit im umgebenden wässrigen Medium heraus zu diffundieren. Eine größere Löslichkeit im wässrigen Medium erzwingt einen Gradienten im Gas des Mikrokügelchens, so dass das Gas die Tendenz aufweist, aus diesem Mikrokügelchen heraus zu diffundieren. Eine geringere Löslichkeit im wässrigen Milieu wird andererseits den Gradienten zwischen dem Mikrokügelchen und der Zwischenschicht verringern oder eliminieren, so dass die Diffusion des Gases aus dem Mikrokügelchen heraus behindert wird. Vorzugsweise weist das im Mikrokügelchen eingeschlossene Gas eine Löslichkeit auf, die geringer als die Löslichkeit des Sauerstoffs ist, d. h. ein Teil Gas in 32 Teilen Wasser. Siehe Matheson Gas Data Book, 1966, Matheson Company Inc. Weiter bevorzugt besitzt das im Mikrokügelchen eingeschlossene Gas eine Wasserlöslichkeit die unter der Wasserlöslichkeit von Luft liegt; noch weiter bevorzugt enthält das im Mikrokügelchen eingeschlossene Gas ein Gas, welches eine Wasserlöslichkeit besitzt, die geringer als die Wasserlöslichkeit von Stickstoff ist.

Stabilisierende Verbindungen

[0058] Zur Bildung der Mikrokügelchen wird eine oder mehrere stabilisierende Verbindungen eingesetzt, um eine nachhaltige Verkapselung der Gase oder der gasförmigen Vorstufen sicherzustellen. Selbst im Falle von relativ unlöslichen, nicht diffundierbaren Gasen, wie z. B. Perfluorpropan oder Schwefelhexafluorid, werden verbesserte Mikrokügelchen-Präparate erhalten, wenn eine oder mehrere stabilisierende Verbindungen bei der Bildung der mit dem Gas oder der gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen sowie irgendeines daraus resultierenden Schaums zur Verwendung bei der topischen und subkutanen Zufuhr verschiedener Wirkstoffe eingesetzt werden. Diese Verbindungen erhalten die Stabilität und Integrität der Mikrokügelchen im Hinblick auf deren Größe, Form und/oder andere Eigenschaften.

[0059] Die Begriffe "stabil" oder "stabilisiert", welche hier verwendet werden, bedeuten, dass die Mikrokügelchen und/oder der aus ihnen gebildete Schaum im wesentlichen stabil gegenüber Zersetzung bzw. Abbau sind, d. h., dass sie gegenüber dem Verlust der Mikrokügelchen-Struktur oder des verkapselten Gases oder der gasförmigen Vorstufe für eine gewöhnliche Zeitdauer resistent sind. Typischerweise weisen die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen und/oder der Schaum eine gute Lagerfähigkeit auf, wobei oft mindestens etwa 90 Vol.-% ihrer ursprünglichen Schaumstruktur für eine Zeitdauer von mindestens etwa 2 oder 3 Wochen bei normalen Umgebungsbedingungen aufrecht erhalten werden, obwohl es bevorzugt wird, dass diese Zeitdauer mindestens einen Monat beträgt, weiter bevorzugt mindestens 2 Monate, noch weiter bevorzugt mindestens 6 Monate, immer noch weiter bevorzugt 18 Monate und besonders bevorzugt 3 Jahre. Somit weisen die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen und der Schaum typischerweise eine gute Lagerfähigkeit auf, manchmal sogar unter ungünstigen Bedingungen wie z. B. Temperaturen und Drücken, welche oberhalb oder unterhalb der unter normalen Umgebungsbedingungen beobachteten Werte liegen.

[0060] Die Stabilität der Mikrokügelchen und des Schaums, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, ist zumindest teilweise auf die Materialien zurückzuführen, aus welchen diese Mikrokügelchen und der Schaum hergestellt sind, und es ist oft nicht notwendig, zusätzliche stabilisierende Additive einzusetzen, obwohl dies optional erfolgen kann und oft bevorzugt wird; solche zusätzlichen Stabilisierungsmittel und ihre Eigenschaften werden im Folgenden detaillierter beschrieben. Die Materialien, aus welchen die Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, konstruiert sind, sind vorzugsweise biokompatible Lipid- oder Polymermaterialien, und von diesen werden die biokompatiblen Lipide besonders bevorzugt. Zusätzlich können diese Mikrokügelchen und der Schaum aufgrund der Leichtigkeit ihrer Formulierung, d.h. der Fähigkeit, Mikrokügelchen oder den Schaum unmittelbar vor ihrer Verabreichung zu ergeben, Bequemerweise an Ort und Stelle hergestellt werden.

[0061] Die Lipide und Polymere, welche bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Mikrokügelchen eingesetzt werden, sind biokompatibel. Mit dem Begriff "biokompatibel" wird ein Lipid oder Polymer bezeichnet, welches, wenn es in das Gewebe eines menschlichen Patienten eingeführt wird, in keiner Weise zu einem nicht akzeptablen Ausmaß an Toxizität führt, einschließlich allergischer Reaktionen und Krankheitszustände. Vorzugsweise sind die Lipide oder Polymere inert.

– Biokompatible Lipide

[0062] Bei den biokompatiblen Lipidmaterialien wird es bevorzugt, dass derartige Lipidmaterialien eine oft als "amphiphil" bezeichnete Natur aufweisen (d. h. ein polares Lipid), worunter irgendeine Zusammensetzung von Materie verstanden wird, welche einerseits lipophile, d. h. hydrophobe Eigenschaften aufweist, während sie andererseits gleichzeitig hydrophile Eigenschaften aufweist.

[0063] Hydrophile Gruppen können geladene Bereiche oder andere Gruppen sein, welche eine Affinität für Wasser aufweisen. Natürliche und synthetische Phospholipide sind Beispiele von Lipiden, die zur Herstellung der stabilisierten Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, nützlich sind. Sie enthalten geladene Phosphat "Kopfgruppen", welche hydrophil sind und an lange Kohlenwasserstoffschwänze gebunden sind, welche hydrophob sind. Diese Struktur erlaubt es den Phospholipiden, eine einzelne (unilamellare) Doppelschichtanordnung einzunehmen, in welcher alle wasserunlöslichen Kohlenwasserstoffschwänze untereinander in Kontakt stehen, wodurch die stark geladenen Phosphat-Kopfregionen zur Wechselwirkung mit einer polaren wässrigen Umgebung freibleiben. Es ist einzusehen, dass eine Serie von konzentrischen Doppelschichten möglich ist, d. h. eine oligolamellare und multilamellare Anordnung, und dass solche Anordnungen ebenfalls als ein Aspekt der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden. Die Fähigkeit zur Bildung solcher Doppelschicht-Anordnungen ist eine Eigenschaft der Lipidmaterialien, welche in der vorliegenden Erfindung verwendbar sind.

[0064] Das Lipid kann alternativ in Form einer Monoschicht vorliegen, und die Monoschicht-Lipide können zur Bildung einer einzelnen (unilamellaren) Monoschicht-Anordnung verwendet werden. Alternativ kann das Monoschicht-Lipid zur Bildung einer Serie von konzentrischen Monoschichten verwendet werden, d. h. oligolamellare oder multilamellare Anordnungen, wobei derartige Anordnungen ebenfalls als im Rahmen der vorliegenden Erfindung befindlich angesehen werden.

[0065] Es wurde ebenfalls als zum Erhalt der stabilisierten Mikrokügelchen, welche zur Herstellung der topischen oder subkutanen Zufuhrmittel der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wichtig erkannt, dass diese bei einer Temperatur unterhalb der Gel/Flüssigkristall-Phasenübergangstemperatur eines als Stabilisierungsverbindung verwendeten Lipids hergestellt werden. Diese Phasenübergangstemperatur ist diejenige Temperatur, bei welcher eine Lipid-Doppelschicht von einem Gelzustand in einen flüssigkristallinen Zustand übergeht. Siehe z. B. Chapman et al., J. Biol. Chem. 1974 249, 2512–2521.

[0066] Es wird vermutet, dass allgemein, je höher die Phasenübergangstemperatur vom Gelzustand in den flüssigkristallinen Zustand ist, desto undurchdringlicher die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen bei irgendeiner gegebenen Temperatur sind. Siehe Derek Marsh, CRC Handbook of Lipid Bilayers (CRC Press, Boca Raton, FL, 1990), S. 139, im Hinblick auf die Hauptketten-Schmelzübergänge von gesättigten Diacyl-sn-glycero-3-phosphorcholinen. Die Phasenübergangstemperaturen vom Gelzustand in den flüssigkristallinen Zustand verschiedener Lipide erschließen sich dem Fachmann leicht und sind z. B. in Gregoriadis, Hrsg., Liposome Technology, Band I, 1–18 (CRC Press, 1984) beschrieben. Die nachfolgende Tabelle führt einige der betreffenden Lipide und ihre Phasenübergangstemperaturen auf:

TABELLE 2

Gesättigte Diacyl-sn-glycero(3)phosphocholine: Hauptketten-Phasenübergangstemperaturen [*]

Kohlenstoffe in den Acylketten	Hauptketten-Phasenübergangstemperatur („Main Phase Transition Temperature") (°C)
1,2-(12:0)	–1,0
1,2-(13:0)	13,7
1,2-(14:0)	23,5
1,2-(15:0)	34,5
1,2-(16:0)	41,4
1,2-(17:0)	48,2
1,2-(18:0)	55,1
1,2-(19:0)	61,8
1,2-(20:0)	64,5
1,2-(21:0)	71,1
1,2-(22:0)	74,0
1,2-(23:0)	79,5
1,2-(24:0)	80,1

[1]*Derek Marsh, "CRC Handbook of Lipid Bilayers", CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990, S. 139

[0067] Es wurde gefunden, dass es möglich ist, die Stabilität der Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, zu verbessern, indem zumindest eine geringe Menge, d.h. etwa 1 bis etwa 10

mol-% des Gesamtlipids, eines negativ geladenen Lipids in das Lipid inkorporiert wird, aus welchem die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen hergestellt werden sollen. Geeignete negativ geladene Lipide umfassen z. B. Phosphatdidylserin, Phosphatidsäure und Fettsäuren. Solche negativ geladenen Lipide ergeben eine zusätzliche Stabilität, indem sie der Tendenz der Mikrokügelchen entgegenwirken, durch gegenseitige Verschmelzung aufzubrechen, d. h., die negativ geladenen Lipide tendieren dazu, eine gleichmäßige, negativ geladene Schicht an der äußeren Oberfläche des Mikrokügelchens zu bilden, welche von einer ähnlich geladenen äußeren Schicht auf den anderen Mikrokügelchen abgestoßen wird. Auf diese Art und Weise besteht eine Tendenz, dass die Mikrokügelchen daran gehindert werden, untereinander in Berührungsnähe zu kommen, was oft zu einem Zerreißen der Membran bzw. Haut der entsprechenden Mikrokügelchen und Konsolidierung der sich berührenden Mikrokügelchen in ein einzelnes, größeres Mikrokügelchen führen würde. Ein Fortschreiten dieses Konsolidierungsprozesses würde natürlich zu einem signifikanten Zerfall der Mikrokügelchen und des Schaums führen.

[0068] Das Lipidmaterial oder die andere stabilisierende Verbindung, welche zur Herstellung der Mikrokügelchen verwendet wird, ist ebenfalls vorzugsweise flexibel, womit im Zusammenhang mit den mit Gas oder gasförmger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen die Fähigkeit einer Struktur gemeint ist, ihre Form zu ändern, um beispielsweise durch eine Öffnung hindurchzutreten, welche eine unter der Größe der Mikrokügelchen liegende Größe aufweist.

[0069] Bei der Auswahl eines Lipids zur Herstellung der stabilisierten Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, findet man eine große Vielzahl von Lipiden, welche für deren Herstellung geeignet sind. Besonders nützlich sind irgendwelche Materialien oder Kombinationen davon, welche dem Fachmann als für die Liposomenherstellung geeignet bekannt sind. Die verwendeten Lipide können entweder natürlichen, synthetischen oder semisynthetischen Ursprungs sein.

[0070] Lipide, die zur Herstellung der mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, verwendet werden können, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein: Lipide wie zum Beispiel Fettsäuren, Lysolipide, Phosphatidylcholin mit sowohl gesättigten als auch ungesättigten Lipiden einschließlich Dioleoylphosphatidylcholin; Dimyristoylphosphatidylcholin; Dipentadecanoylphosphatidylcholin; Dilauroylphosphatidylcholin; Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC); Distearoylphosphatidylcholin (DSPC); Phosphatidylethanolamine wie zum Beispiel Dioleoylphosphatidylethanolamin und Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE); Fhosphatidylserin; Phosphatidylglycerin; Phosphatidylinositol; Sphingolipide wie zum Beispiel Sphingomyelin; Glycolipide wie zum Beispiel Gangliosid GM1 und GM2; Glukolipide; Sulfatide; Glycosphingolipide; Phosphatidsäuren wie zum Beispiel Dipalymitoylphosphatididsäure (DPPA); Palmitinsäure; Sterinäure; Arachidonsäure; Ölsäure; Lipid-tragende Polymere wie zum Beispiel Polyethyleneglycol, d. h. PEG-yilierte Lipide, Chitin, Hyaluronsäure oder Polyvinylpyrrolidon; Lipid-tragende sulfonierte Mono-, Di-, Oligo- oder Polysaccharide; Cholesterin, Cholesterinsulfat und Cholesterinhemisuccinat; Tocopherolhemisuccinat; Lipide mit über Ether- und Esterbindungen verknüpften Fettsäuren; polymerisierte Lipide (eine große Vielzahl davon ist im Stand der Technik wohlbekannt); Diacetylphosphat; Dicetylphosphat; Stearylamin; Cardiolipin; Phospholipide mit kurzkettigen Fettsäuren einer Kettenlänge von 6- bis 8 Kohlenstoffen; synthetische Phospholipide mit asymmetrischen Acylketten (z. B. mit einer Acylkette von 6 Kohlenstoffatomen und einer anderen Acylkette von 12 Kohlenstoffatomen); Ceramide; nicht-ionische Liposomen einschließlich Niosomen wie z. B. Polyoxyethylen-Fettsäureester, Polyoxyethylen-Fettalkohole, Polyoxyethylen-Fettalkoholether, polyoxyethylenisierter Sorbitanfettsäureester, Glycerinpolyoxyethylenglycol-oxystearat, Glycerinpolyoxyethylenglycolrizinoleat, ethoxylierte Sojabohnensterole, ethoxyliertes Rizinusöl, Polyoxyethylenpolyoxypropylen-Polymere und Polyoxypropylen-Fettsäurestearate; Sterol-aliphatische Säureester einschließlich Cholesterinsulfat, Cholesterinbutyrat, Cholesteriniso-isobutyrat, Cholesterinpalmitat, Cholesterinstearat, Lanosterolacetat, Ergosterolpalmitat und Phytosterol-n-butyrat; Sterolester von Zuckersäuren einschließlich Cholesteringlucuronid, Lanosterolglucuronid, 7-Dehydrocholesteringlucuronid, Ergosterolglucuronid, Cholesteringluconat, Lanosterolgluconat und Ergosterolgluconat; Ester von Zuckersäuren mit Alkoholen einschließlich Laurylglucunoronid, Stearoylglucuronid, Myristoylglucuronid, Laurylgluconat, Myristoylgluconat und Stearoylgluconat, Ester von Zuckern mit aliphatischen Säuren einschließlich Saccharoselaurat, Fructoselaurat, Saccharosepalmitat, Saccharosestearat, Glucuronsäure, Gluconsäure, Accharinsäure und Polyuronsäure; Saponine einschließlich Sarsasapogenin, Smilagenin, Hederagenin, Oleanosäure und Digitoxigenin; Glycerindilaurat, Glycerintrilaurat, Glycerintripalmitat, Glycerin und Glycerinester einschließlich Glycerintripalmitat, Glycerindistearat, Glycerintristearat, Glycerindimyristat, Glycerintrimyristat; langkettige Alkohole einschließlich n-Decylalkohol, Laurylalkohol, Myristylalkohol, Cetylalkohol und n-Octadecylalkohol; 6-(5-Cholesten-3β-yloxy)-1-thio-β-D-galactophyranosid; Digalactosyldiglycerid; 6-(5-Cholesten-3β-yloxy)hexyl-6-amino-6-desoxy-1-thio-β-D-galactophyranosid; 6-(5-Cholesten-3β-yloxy)hexyl-6-amino-6-desoxy-1-thio-α-D-mannopyranosid; 12-(((7'-Diethylaminocumarin-3-yl)carbonyl)methylamino)-octadecansäure; N-[12-(((7'-Diethylaminocumarin-3-yl)carbonyl)methyl-amino)octadecanoyl]-2-aminopalmitinsäure; Cholesteryl(4'-trimethyl-amino)butanoat; N-Succinyldioleoylphosphatidylethanolamin; 1,2-Dioleoyl-sn-glycerol; 1,2-Dipalmitoyl-sn-3-succinylglycerin; 1,3-Dipalmitoyl-2-succinylglycerin; 1-Hexadecyl-2-palmitoyl-glycerophophosphoethanolamin und Palmi-

toylhomocystein und/oder Kombinationen davon.

[0071] Falls erwünscht, kann eine Vielzahl von kationischen Lipiden wie zum Beispiel DOTMA, N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid; DOTAP, 1,2-Dioleoyloxy-3-(trimethylammoniim)propan; und DOTB, 1,2-Dioleoyl-3-(4'-trimethyl-ammonium)butanoyl-sn-glycerin verwendet werden. Im Allgemeinen kann das Molverhältnis des kationischen Lipids zum nicht-kationischem Lipid im Liposom z. B. 1 : 1000, 1 : 100, vorzugsweise zwischen 2:1 bis 1:10, weiter bevorzugt im Bereich zwischen 1 : 1 und 1 : 2,5 und besonders bevorzugt 1:1 betragen (Verhältnis der molaren Menge an kationischem Lipid zur molaren Menge an nicht-kationischen Lipid, zum Beispiel DPPC). Das nicht-kationische Lipid kann eine große Vielzahl von Lipiden umfassen, wenn ein kationisches Lipid zur Konstruktion des Mikrokügelchens verwendet wird. Vorzugsweise ist dieses nicht-kationische Lipid Dipalmitoylphosphatidylcholin, Dipalmitoylphosphatidylethanolamin oder Dioleoylphosphatidylethanolamin. Anstelle der oben beschriebenen kationischen Lipide können kationische Polymere tragende Lipide wie zum Beispiel Polylysin oder Polyarginin sowie Alkylphosphonate, Alkylphosphinate und Alkylphosphite ebenso zur Konstruktion der Mikrokügelchen verwendet werden.

[0072] Die am meisten bevorzugten Lipide sind Phospholipide, vorzugsweise DPPC, DPPE, DPPA und DSPC am bevorzugtesten DPPC.

[0073] Darüber hinaus können Beispiele von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, welche zur Herstellung der in der vorliegenden Erfindung in Form von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten, gemischten Micellen verwendeten stabilisierten Mikrokügelchen verwendet werden können, Moleküle umfassen, welche vorzugsweise zwischen 12 und 22 Kohlenstoffatomen in entweder linearer oder verzweigter Form enthalten können. Gleichermaßen können Kohlenwasserstoffgruppen, bestehend aus Isopreneinheiten und/oder Prenylgruppen verwendet werden. Beispiele geeigneter gesättigter Fettsäuren umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure und Sterinsäure; Beispiele ungesättigter Fettsäuren, welche verwendet werden können, sind, ohne darauf beschränkt zu sein, Lauroleinsäure, Physeterinsäure, Myristoleinsäure, Palmitoleinsäure, Petroselinsäure und Ölsäuren; Beispiele von verzweigten Fettsäuren, welche verwendet werden können, sind, ohne darauf beschränkt zu sein, Isolaurinsäure, Isomyristinsäure, Isopalmitinsäure und Isostearinsäure. Zusätzlich zu den gesättigten und ungesättigten Gruppen können die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten, gemischten Micellen auch aus Isoprenoid- und Prenylgruppen mit 5 Kohlenstoffatomen bestehen.

– Biokompatible Polymere

[0074] Die biokompatiblen Polymere, welche als Stabilisierungsverbindungen zur Herstellung der erfindungsgemäß verwendeten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen verwendet werden können, können entweder natürlichen, semisynthetischen oder synthetischen Ursprungs sein. Der hier verwendete Begriff Polymer bezeichnet eine Verbindung, welche aus zwei oder mehreren, sich wiederholenden monomeren Einheiten besteht, vorzugsweise aus 10 oder mehr sich wiederholenden monomeren Einheiten. Der hier verwendete Begriff semisynthetisches Polymer bezeichnet ein natürliches Polymer, welches auf irgend einer Art und Weise chemisch modifiziert worden ist. Beispiele natürlicher Polymere, welche zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, umfassen natürlich vorkommende Polysaccharide. Solche Polysaccharide umfassen zum Beispiel Arabinane, Fructane, Fucane, Galactane, Galacturonane, Glucane, Mannane, Xylane (wie zum Beispiel Inulin), Levan, Fusoidan, Carragenan, Galatocarolose, Pektinsäure, Pektin, Amylose, Pullulan, Glycogen, Amylopektin, Cellulose, Dextran, Pustulan, Chitin, Agarose, Keratan, Chondroitan, Dermatan, Hyaluronsäure, Alginsäure, Xanthangummi, Stärke und verschiedene andere natürliche Homopolymere oder Heteropolymere wie zum Beispiel solche, welche ein oder mehrere der nachfolgenden Aldosen, Ketosen, Säuren oder Amine enthalten: Enthrose, Threose, Ribose, Arabinose, Xylose, Lyxose, Allose, Altrose, Glucose, Mannose, Gulose, Idose, Galactose, Talose, Erythrulose, Ribulose, Xylulose, Psicose, Fructose, Sorbose, Tagatose, Mannitol, Sorbitol, Laktose, Saccharose, Trehalose, Maltose, Zellobiose, Glycin, Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin, Glutamin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Arginin, Histidin, Glucuronsäure, Gluconsäure, Glucarsäure, Galacturonsäure, Mannuronsäure, Glucosamin, Galactosamin und Neuraminsäure sowie natürlich vorkommende Derivate davon. Beispiele semisynthetischer Polymere umfassen Carboxymethylcellulose, Hydroxymethylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Methylcellulose und Methoxycellulose. Beispiele synthetischer Polymere, welche zur Verwendung in der vorliegender Erfindung geeignet sind, umfassen Polyethylene (wie zum Beispiel Polyethylenglycol, Polyoxyethylen und Polyethlenterephthalat), Polypropylene (wie zum Beispiel Polypropylenglycol), Polyurethane (wie zum Beispiel Polyvinylalkohol (PVA), Polyvinylchlorid und Polyvinylpyrrolidon), Polyamide einschließlich Nylon, Polystyrol, Polymilchsäuren, fluorierte Kohlenwasserstoffe, fluorierte Kohlenstoffverbindungen (wie zum Beispiel Polytetrafluoroethylen) sowie Polymethylmethacrylat und Derivate davon. Verfahren zur Herstellung solcher, auf Polymeren basierenden Mikrokügelchen erschließen sich den Fachleuten auf einfache Weise, sobald sie mit der vorliegenden Offenbarung vertraut sind, wenn die vorliegende Offenbarung mit aus dem Stand der Technik bekannten Informationen verknüpft wird, wie zum Beispiel der Information, welche von Unger im US-Patent Nr. 5,205,290 beschrieben

und referiert wird, deren Offenbarung hier vollständig mittels Bezugnahme eingeschlossen wird.

– Andere stabilisierende Verbindungen und stabilisierende Hilfsmittel

[0075] Es wird ebenfalls als Teil der vorliegenden Erfindung angesehen, stabilisierte, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen und Schaum unter Verwendung von Zusammensetzungen von Materie zusätzlich zu den oben beschriebenen biokompatiblen Lipiden und Polymeren herzustellen, vorausgesetzt, dass die so hergestellten Mikrokügelchen die Stabilitätskriterien und weitere Kriterien, welche im Folgenden angegeben sind, erfüllen. Diese Zusammensetzungen können grundlegend und fundamental sein, das heißt, sie bilden die primäre Basis zur Schaffung bzw. Herstellung der stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen. Sie können andererseits auch Hilfsstoffe sein, d. h. sie wirken als ergänzende bzw. zusätzliche Mittel, welche entweder die Funktionalität der grundlegenden stabilisierten Verbindung bzw. Verbindungen verbessern, oder sie steuern irgendeine gewünschte Eigenschaft zusätzlich zu den von der grundlegenden stabilisierenden Verbindung bewirkten Eigenschaften bei.
[0076] Es ist indessen nicht immer möglich, festzulegen, ob eine gegebenen Verbindung ein grundlegendes oder ergänzendes Mittel ist, da die Funktionalität der in Frage kommenden Verbindung empirisch bestimmt wird, d. h. anhand der Resultate, welche sich in Bezug auf die Herstellung der stabilisieren Mikrokügelchen ergeben. Als Beispiele dafür, wie diese grundlegenden Verbindungen oder Hilfsverbindungen funktionieren, wurde beobachtet, dass die einfache Kombination eines biokompatiblen Lipids und Wasser oder Salzlösung beim Schütteln oft im Anschluss an eine Autoklavenbehandlung zur Sterilisierung eine trübe Lösung eingibt. Eine derartige trübe Lösung kann als ein topisches oder subkutanes Zufuhrmittel wirken, sie ist aber in ästhetischer Hinsicht zu beanstanden und kann eine Instabilität in Form von nicht-gelösten oder nicht-dispergierten Lipidpartikeln implizieren. Daher kann Propylenglycol zur Beseitigung der Trübung durch eine Erleichterung der Dispersion oder Auflösung der Lipidpartikel zugegeben werden. Das Polypropylenglycol kann weiterhin als Verdickungsmittel fungieren, welches die Bildung der Mikrokügelchen und die Stabilisierung mittels Erhöhung der Oberflächenspannung auf der Membran bzw. Haut des Mikrokügelchens erhöht. Es ist möglich, dass das Polypropylenglycol weiterhin als eine zusätzliche Schicht fungiert, welche die Membran bzw. Haut des Mikrokügelchens überzieht und so eine zusätzliche Stabilisierung bewirkt.
[0077] Als Beispiele derartiger weiterer grundlegender Stabilisierungsverbindungen oder stabilisierender Hilfsstoffe können herkömmliche Tenside verwendet werden; siehe D'Arrigo US-Patente Nr. 4,684,479 und 5,215,680.
[0078] Zusätzliche Stabilisierungshilfsstoffe und grundlegende Stabilisierungsverbindungen umfassen Mittel wie zum Beispiel Erdnussöl, Kanolaöl, Olivenöl, Safloröl, Maisöl sowie irgendwelche andere Öle, die als essbar bekannt sind und zur Verwendung als stabilisierende Verbindung gemäß den Erfordernissen und Instruktionen der vorliegenden Spezifikation geeignet sind.
[0079] Darüber hinaus können Verbindungen, welche zur Herstellung von gemischten Micellensystemen verwendet werden, zur Verwendung als grundlegende stabilisierende Verbindungen oder Stabilisierungshilfsstoffe geeignet sein; diese umfassen, ohne darauf geschränkt zu sein: Lauryltrimethylammoniumbromid (Dodecyl-), Cetyltrimethylammoniumbromid (Hexadecyl-), Myristyltrimethylammoniumbromid (Tetradecyl-), Alkyldimethylbenzylammoniumchlorid (Alkyl = C_{12}, C_{14}, C_{16}), Benzyldimethyldodecylammoniumbromid/chlorid, Benzyldimethylhexadecylammoniumbromid/chlorid, Benzyldimethyltetradecylammoniumbromid/chlorid, Cetyldimethylethylammoniumbromid/chlorid oder Cetylpyridiniumbromid/chlorid.
[0080] Es wurde gefunden, dass die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen und Schaum, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, im Hinblick auf ihre Größe, Löslichkeit und Hitzestabilität kontrolliert werden können, indem eine Auswahl aus den verschiedenen zusätzlichen Stabilisierungsmitteln oder Stabilisierungshilfsstoffen, welche hier beschrieben werden, getroffen wird. Diese Mittel können die Parameter der Mikrokügelchen nicht nur durch ihre physikalische Wechselwirkung mit den Lipidbeschichtungen sondern auch durch ihre Fähigkeit, die Viskosität und Oberflächenspannung der Oberfläche der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen beeinflussen. Dementsprechend können die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, günstig modifiziert und weiter stabilisiert werden, z. B. durch Zugabe eines oder mehrerer einer großen Vielzahl von (a) Viskositätsmodifizierungsmitteln, umfassend, ohne darauf beschränkt zu sein, Kohlenhydrate und ihre phosphorylierten und sulfonierten Derivate; Polyether, vorzugsweise mit Molekulargewichtsbereichen zwischen 400 und 100000, Di- und Trihydroxyalkane sowie ihre Polymere, vorzugsweise mit Molekulargewichtsbereichen zwischen 200 und 50000; (b) Emulgierungs- und/oder Solubilisierungsmittel können ebenso in Verbindung mit den Lipiden zur Erreichung gewünschter Modifikationen und einer weiteren Stabilisierung verwendet werden; solche Mittel umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Akazienöl, Cholesterin, Diethanolamin, Glycerinmonostearat, Lanolinalkohole, Lecithin, Mono- und Di-Glyceride, Mono-Ethanolamin, Ölsäure, Oleylalkohol, Poloxamer (z. B. Poloxamer 188, Poloxamer 184 und Poloxamer 181), Polyoxyethylen 50-Stearat, Polyoxyl 35-Rizinusöl, Polyoxyl 10-Oleylether, Polyoxyl 20-Cetostearylether, Polyoxyl 40-Stearat,

Polysorbat 20, Polysorbat 40, Polysorbat 60, Polysorbat 80, Propylenglycoldiacetat, Propylenglycolmonostearat, Natriumlaurylsulfat, Natriumstearat, Sorbitanmonolaurat, Sorbitanmonooleat, Sorbitanmonopalmitat, Sorbitanmonostearat, Stearinsäure, Trolamin und emulgierende Wachse; (c) Suspendierungsmittel und/oder viskositätssteigernde Mittel, welche mit den Lipiden verwendet können, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Akazienöl, Agar, Alginsäure, Aluminiummonostearat, Bentonit, Magma, Carbomer 934P, Carboxymethylcellulose, -Calzium und -Natrium, sowie -Natrium 12, Carrageen, Cellulose, Dextran, Gelatine, Guargummi, Johannisbrotgummi, Veegum, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Magnesiumaluminiumsilikat, Methylcellulose, Pektin, Polyethylenoxid, Povidon, Propylenglycolalginat, Siliziumdioxid, Natriumalginat, Traganthgummi, Xanthangummi, α-D-Gluconolacton, Glycerin und Mannitol; (d) synthetische Suspendierungsmittel können ebenfalls verwendet werden, wie zum Beispiel Polyethylenglycol (PEG), Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyvinylalkohol (PVA), Polypropylenglycol und Polysorbat; und (e) tonizitätssteigernde Mittel können umfasst sein; solche Mittel umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Sorbitol, Propylenglycol und Glycerin.

[0081] Bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen Mikrokügelchen und Schäume, bei denen die stabilisierende Verbindung, aus welcher die stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen gebildet werden, drei Komponenten umfasst: (1) ein neutrales Lipid (z. B. nicht-ionisch oder zwitterionisch), (2) ein negativ geladenes Lipid und (3) ein ein hydrophiles Polymer tragendes Lipid. Die Menge des besagten negativ geladenen Lipids ist vorzugsweise größer als 1 mol-% des anwesenden gesamten Lipids und die Menge des ein hydrophiles Polymer tragenden Lipids ist größer als 1 mol-% des anwesenden gesamten Lipids. Weiterhin wird bevorzugt, dass das besagte negativ geladene Lipid eine Phosphatidsäure ist. Es ist wünschenswert, dass das ein hydrophiles Polymer tragende Lipid kovalent an das besagte Polymer gebunden ist und dass das besagte Polymer vorzugsweise ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts von etwa 400 bis etwa 100000 aufweist. Das hydrophile Polymer ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Polyethylenglycol, Polypropylenglycol, Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon sowie Copolymeren davon. Wenn das hydrophile Polymer ein Polyethylenglycol ist, wird das ein derartiges Polymer tragende Lipid mit Bezug auf die Abkürzung für Polyethylenglycol "PEG" als "PEG-yliert" bezeichnet. Dieses ein hydrophiles Polymer tragende Lipid ist vorzugsweise Dipalmitoylphosphatidylethanolamin-Polyethylenglycol 5000, d. h., ein Polyethylenglycol mit einem mittleren Gewichtsmittel des Molekulargewichts von etwa 5000; oder Distearoyl-Phosphatidylethanolamin-Polyethylenglycol 5000.

[0082] Bevorzugte Ausführungsformen der auf Mikrokügelchen und Schaum basierenden topischen und subkutanen Zufuhrmittel, welche bei der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden, würden beispielsweise umfassen: 77,5 mol-% Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) mit 12,5 mol-% Dipalmitoylphosphatidsäure (DPPA) und 10 mol-% Dipalmitoylphosphatidylethanolamin-Polyethylenglycol-5000 (DPPE/PEG5000), d. h. ein Polyethylenglycol mit einem mittleren Gewichtsmittel des Molekulargewichts von etwa 5000. Diese Zusammensetzungen mit einem Molprozent-Verhältnis von jeweils 82/10I8 werden ebenfalls bevorzugt. Die DPPC-Komponente ist im wesentlichen neutral, da der Phosphatidyl-Anteil negativ geladen ist und der Cholin-Anteil positiv geladen ist. Konsequenterweise wird die DPPA-Komponente, welche negativ geladen ist, zur Verbesserung der Stabilisierung gemäß dem weiter oben beschriebenen Mechanismus, der die negativ geladenen Lipide als zusätzliches Mittel betrifft, zugegeben. Die dritte Komponente, das DPPE/PEG, stellt ein PEG-yliertes Material zur Verfügung, welches an die Lipidmembran der Haut des Mikrokügelchens über die DPPE-Gruppe gebunden ist, wobei die PEG-Gruppe zum Umgeben der Membran oder Haut des Mikrokügelchens frei ist, und dadurch eine physikalische Barriere gegenüber verschiedenen enzymatischen sowie anderen endogenen, im Körper vorkommenden Wirkstoffen bildet, deren Funktion darin besteht, derartige Fremdmaterialien abzubauen. Weiterhin besteht die Theorie, dass das PEG-ylierte Material aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Wasser in der Lage ist, die Wirkung der Makrophagen des menschlichen Immunsystems zu unterdrücken, welche ansonsten die Tendenz aufweisen, einen Fremdstoff zu umgeben und zu entfernen. Dies hat zur Folge, dass die Zeit erhöht wird, innerhalb derer die stabilisierten Mikrokügelchen als auf Schaum basierende topische und subkutane Zufuhrmittel wirken können.

Wässrige Verdünnungsmittel

[0083] Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, ist dann, wenn die Mikrokügelchen eine Lipidnatur aufweisen, insbesondere eine Doppelschicht, eine essentielle Komponente der stabilisierten Mikrokügelchen eine wie auch immer geartete wässrige Umgebung, welche dazu führt, dass das Lipid aufgrund seiner hydrophoben/hydrophilen Natur Mikrokügelchen bildet, welche die stabilste Konfiguration darstellen, die in einer derartigen Umgebung erreicht werden kann. Die Verdünnungsmittel, welche zur Schaffung einer solchen wässrigen Umgebung eingesetzt werden können, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Wasser, nämlich entweder entionisiertes Wasser oder Wasser, das eine Anzahl von gelösten Salzen enthält, die nicht mit der Schaffung und Aufrechterhaltung der stabilisierten Mikrokügelchen oder ihrer Verwendung als topische und subkutane Zufuhrmittel interferieren; sowie normale Salzlösung und physiologische Salzlösung.

Wirkstoffe

[0084] Die vorliegende Erfindung stellt mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen sowie ein Verfahren zur Verwendung solcher Mikrokügelchen für die topische oder subkutane Zufuhr zu einem ausgewählten Gewebe eines Patienten eines oder mehrerer einer Vielzahl von Wirkstoffen zur Verfügung. Der allgemeine Begriff "Wirkstoff' wird hier zu dem Zweck gebraucht, eine Anzahl von funktional verschiedenen Kategorien von Materialien, welche eingesetzt werden können, zu umfassen. Mit dem hier verwendeten Begriff "Wirkstoff' wird eine Verbindung oder Zusammensetzung bezeichnet, welche zur Bereitstellung eines therapeutischen oder kosmetischen Nutzens bestimmt ist. So existieren beispielsweise zusätzlich zu einer Vielzahl von therapeutischen Mitteln (z. B. Medikamenten), welche hier eingesetzt werden können, eine Anzahl von Behandlungsmitteln, welche als Kosmetika betrachtet werden können und unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mikrokügelchen oder des Schaums topisch oder subkutan angewendet werden können. Diese umfassen, ohne dass hier beabsichtigt wird, die vorliegende Erfindung einzuschränken, verschiedene Vitamine und andere Mittel, welche die Eigenschaft aufweisen, die Haut wiederherzustellen und Falten entgegenzuwirken, sowie Sonnenschutzmittel und insektenabstoßende Mittel. Die in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen einzusetzende effektive Menge des Wirkstoffs schwankt, wie der Fachmann erkennt, in Abhängigkeit von Faktoren wie dem Alter des Patienten, der Größe das Patienten und dem Patiententyp, welchem die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verabreicht werden sollen, sowie in Abhängigkeit von der Art und Weise, wie die Verabreichung durchgeführt werden soll (topisch, subkutan; mit oder ohne Depot-Bildung), der beabsichtigten besonderen therapeutischen, kosmetischen oder sonstigen Anwendung und dem zu erreichenden therapeutischen, kosmetischen oder sonstigen Effekt. Der Fachmann wird, sobald er mit der vorstehend beschriebenen Information ausgestattet ist, leicht in der Lage sein, die effektive Menge des einzusetzenden Wirkstoffs zu bestimmen.

[0085] Die Mikrokügelchen können auch so konstruiert sein, dass eine Verteilung des Wirkstoffs im Inneren und/oder Äußeren des Mikrokügelchens vorliegt. Diese Verteilung kann sowohl im Inneren als auch im Äußeren vorliegen und kann symmetrisch oder asymmetrisch sein.

[0086] Die besondere chemische Struktur des Wirkstoffs kann so ausgewählt oder modifiziert werden, dass die gewünschte Löslichkeit erreicht wird, so dass der Wirkstoff entweder im Innenraum des mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchens verkapselt ist, an die Außenseite des Mikrokügelchens (kovalent oder auf sonstige Art und Weise) gebunden ist, in der Wand des Mikrokügelchens eingeschlossen ist oder einfach nur mit dem Mikrokügelchen assoziiert ist (das heißt, weder von diesem verkapselt noch an dieses gebunden ist). So kann beispielsweise der an die Oberfläche gebundene Wirkstoff eine oder mehrere Acylketten tragen, so dass dann, wenn das Mikrokügelchen durch die topische Verabreichung aufgebrochen, erhitzt oder mittels durch die Anwendung von Ultraschall, Mikrowellen, Licht oder magnetische Induktionsenergie bewirkte Kavitation aufgebrochen wird, wie dies weiter unten ausführlich beschrieben wird, der acylierte Wirkstoff anschließend die Oberfläche verlassen kann und/oder der Wirkstoff beispielsweise von den Acylketten der chemischen Gruppe, an die er gebunden ist, abgespalten werden kann. In ähnlicher Weise können andere Wirkstoffe mit einer hydrophoben Gruppe formuliert werden, welche beispielsweise eine aromatische oder Sterol-Struktur aufweist, um diese in die Oberfläche der Haut bzw. Membran des Mikrokügelchens zu inkorporieren.

– Kosmetische Mittel

[0087] Verschiedene Typen von kosmetischen Formulierungen, auf welche die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung anwendbar sind, und an welche diese in vorteilhafter Weise angepasst werden können, umfassen unter anderem kosmetische Cremes, Salben, Lotionen, Hautweichmacher, Gels, Rouge, Eyeliner, Mascara, Akne-Medikamente, halbfette Cremes, Reinigungscremes und ölhaltige Schäume. Kosmetische Mittel, welche in die Mikrokügelchen und den Schaum der vorliegenden Erfindung inkorporiert werden können, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein: Vitamin A, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E, Vitamin K, Betacarotin, Collagen, Elastin, Retinolsäure, Retinolpalmitat, Aloe vera, Lanolin, Hyaluronsäure und Nucleoside.

[0088] Die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen sind recht nützlich zur Zufuhr von Sonnenschutzmitteln zu einem ausgewählten Gewebe. Derartige Sonnenschutzmittel umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein: 4% Benzylsalicylat und Benzylcinnamat (jeweils 2%); 5% Cycloform (Isobutyl-p-aminobenzoat), 5% Diallyltrioleat; 2,5% Monoglyceryl-p-aminobenzoat; 4% Propylenglycol-p-aminobenzoat sowie andere nicht-absorbierende Verbindungen.

– Therapeutische Mittel

[0089] Zu den therapeutischen Mitteln, welche topisch oder subkutan an ein ausgewähltes Gewebe eines Pa-

tienten unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mikrokügelchen angewendet werden können, zählen fungizide Mittel wie z. B. Ketoconazol, Nystatin, Griseofulvin, Flucytosin (5-fc), Miconazol sowie Amphotericin B, Honnone wie z. B. das Wachstumshormon, das Melanocyten-stimulierende Hormon, Estradiol, Beclomethasondipropionat, Betamethason, Betamethasonacetat und Betametasonnatriumphosphat, Vetamethasondinatriumphosphat, Vetamethasonnatriumphosphat, Cortisonacetat, Dexamethason, Dexamethasonacetat, Dexamethasonnatriumphosphat, Flunisolid, Hydrocortison, Hydrocortisonacetat, Hydrocortisoncypionat, Hydrocortisonnatriumphosphat, Hydrocortisonnatriumsuccinat, Methylprednisolon, Methylprednisolonacetat, Methylprednisolonnatriumsuccinat, Paramethasonacetat, Prednisolon, Prednisolonacetat, Prednisolonnatriumphosphat, Prednisolontebutat, Prednison, Triamcinolon, Triamcinolonacetonid, Triamcinolondiacetat, Triamcinolonhexacetonid und Fludrocortisonacetat; Vitamine wie z. B. Cyanocobalaminneionsäure, Retinoide und Derivate wie z. B. Retinolpalmitat sowie α-Tocopherol; Peptide wie z. B. Mangansuperoxiddismutase; Enzyme wie z. B. alkalische Phosphatase; antiallergische Wirkstoffe wie z. B. Amelexanox; anticoagulierende Mittel wie z. B. Phenprocoumon und Heparin, Antituberkulosemittel wie z. B. para-Aminosalicylsäure, Isoniazid, Capreomycinsulfatcycloserin, Ethambutolhydrochloridethionamid, Pyrazinamid, Rifampin und Streptomycinsulfat; Antivirusmittel wie z. B. Acyclovir, Amantadin, Azidothymidin (AZT oder Zidovudin), Ribavirin und Vidarabinmonohydrat (Adeninarabinosid, Ara-A); Antibiotika wie z. B.

[0090] Dapson, Chloramphenicol, Neomycin, Cefaclor, Cefadroxil, Cephalexin, Cephradinerythromycin, Clindamycin, Lincomycin, Amoxicillin, Ampicillin, Bacampicillin, Carbenicillin, Dicloxacillin, Cyclacillin, Picloxacillin, Hetacillin, Methicillin, Nafcillin, Oxacillin, Penicillin G, Penicillin V, Ticarcillin, Rifampin und Tetracyclin; entzündungshemmende Mittel wie z. B. Diflunisal, Ibuprofen, Indomethacin, Meclofenamat, Mefenamsäure, Naproxen, Oxyphenbutazon, Phenylbutazon, Piroxicam, Sulindac, Tolmetin, Aspirin und Salicylate; gegen Protozoen gerichtete Mittel wie z. B. Chloroquin, Hydroxychloroquin, Metronidazol, Chinin und Megluminantimonat; lokale Anästhetika wie z. B. Bupivacinhydrochlorid, Chlorprocainhydrochlorid, Etidocainhydrochlorid, Lidocainhydrochlorid, Mepivacainhydrochlorid, Procainhydrochlorid und Tetracainhydrochlorid; Wachstumsfaktoren wie z. B. Epidermal Growth Factor (EGF), Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Insulin-Like Growth Factors (IGF) Typ 1 und 11, Nerve Growth Factor (NGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Stem Cell Factor (SCF) sowie Transforming Growth Factor (TGF) der α- oder β-Familie; cardiovasculäre Mittel wie z. B. Clonidin, Propranolol, Lidocain, Nicardipin und Nitroglycerin; Diuretica wie z. B. Mannitol und Harnstoff; sowie radioaktive Teilchen oder Ionen wie z. B. Strontium, Iod, Rhenium und Yttrium; zusammen mit vielen anderen Mitteln wie z. B. Scopolamin, Nikotin, Methylnicotinat, Mechlorisondibutyrat, Naloxon, Methanol, Koffein, Salicylsäure und 4-Cyanophenol.

[0091] Darüber hinaus sind diese Mikrokügelchen besonders geeignet zur Zufuhr eines Peptids zu einem ausgewählten Gewebe. Als Beispiele, die den Umfang der vorliegenden Erfindung nicht beschränken sollen, können die nachfolgenden Peptide in die Mikrokügelchen und den Schaum zum Zwecke der topischen oder subkutanen Anwendung bzw. Zufuhr inkorporiert werden: Melanin-konzentrierendes Hormon, Melanin-stimulierendes Hormon, Trypsininhibitor, Bowman Burk-Inhibitor, luteinisierendes Hormon-freisetzendes Hormon (LHRH), Bombesin, Cholecystokinin, Insulin, Gastrin, Endorphine, Enkephaline, Wachstumshormon, Prolactin, Oxytocin, Follikel-stimulierendes Hormon (FSH), humanes chorionisches Gonadotropin, Corticotropin, β- und Liptotropin, Calcitonin, Glucagon, Thyrotropin, Elastin, Cyclosporin und Collagen. Darüber hinaus können auch alle verfügbaren Antagonisten gegen die oben genannten Peptide ebenfalls verwendet werden. Weiterhin können Faktoren wie z. B. Hyaluronsäure, Heparin und Heparinsulfat verwendet werden.

[0092] Bei bestimmten bevorzugten Ausführungsfonnen stellt das therapeutische Mittel einen monoklonalen Antikörper dar wie z. B. einen monoklonalen Antikörper, der an das Melanom-Antigen binden kann. Derartige monoklonale Antikörper können weiterhin zur Zielführung anderer therapeutischer Mittel, an welche sie unter Bildung eines Addukts oder Komposits gebunden sind, verwendet werden. Die sehr genauen Erkennungseigenschaften des monoklonalen Antikörpers können mit Vorteil zur Beförderung des therapeutischen Mittels, an welches dieser gebunden ist, an den spezifischen Wirkort, an welchem das therapeutische Mittel wirkt, verwendet werden. Eine derartige Zielführung stellt einen großen Wert z. B. bei der Chemotherapie von bösartigen Tumoren dar, bei welcher die Toxizität des chemotherapeutischen Mittels dessen systemische Verwendung in hohen Konzentrationen verhindert.

[0093] Andere bevorzugte Therapeutika umfassen genetisches Material wie z B. Nucleinsäuren, RNA und DNA natürlichen oder synthetischen Ursprungs, einschließlich rekombinanter RNA und DNA sowie Antisense-RNA und -DNA. Typen von genetischem Material, welches verwendet werden kann, umfassen z. B. Gene, welche getragen werden von Expressionsvektoren wie z. B. Plasmiden, Phagemiden, Cosmiden, künstlichen Hefechromosomen (YACs) und defekten Viren oder Helper-Viren, Antigen-Nucleinsäuren, einsträngige und doppelsträngige RNA und DNA sowie Analoga davon wie z. B. Phosphorthioat-, Phosphoramidat- und Phosphordithioat-Oligonucleotiden. Darüber hinaus kann das genetische Material beispielsweise mit Proteinen oder anderen Polymeren kombiniert werden.

[0094] Beispiele von genetischen Therapeutika, welche unter Verwendung der Mikrokügelchen und des Schaums der vorliegenden Erfindung angewendet werden können, umfassen DNA, welche zumindest einen

Teil eines HLA-Gens codiert, DNA, welche zumindest einen Teil des Dystrophins codiert, DNA, welche zumindest einen Teil des CFTR codiert, DNA, welche zumindest einen Teil des IL-2 codiert, DNA, welche zumindest einen Teil des TNF codiert, sowie Antisense-Oligonucleotide, welche zur Bindung an DNA befähigt sind, welche zumindest einen Teil des Ras codiert.

[0095] DNA, welche bestimmte Proteine codiert, kann zur Behandlung vieler verschiedener Krankheitstypen verwendet werden. So kann beispielsweise Adenosindesaminase zur Behandlung des ADA-Mangels bereitgestellt werden; der Tumornekrosefaktor und/oder Interleukin-2 können zur Behandlung von Krebs im fortgeschrittenen Stadium bereitgestellt werden; der HDL-Rezeptor kann zur Behandlung der Lebererkrankung bereitgestellt werden; Thymidinkinase kann zur Behandlung von Eierstockkrebs, Gehirntumoren oder der HIV-Infektion bereitgestellt werden; HLA-B7 kann zur Behandlung bösartiger Melanome bereitgestellt werden; Interleukin-2 kann zur Behandlung von Neuroblastomen, bösartigen Melanomen oder Nierenkrebs bereitgestellt werden; Interleukin kann zur Behandlung von Krebs bereitgestellt werden; HIV-env kann zur Behandlung der HIV-Infektion bereitgestellt werden; Antisense-Ras/p53 kann zur Behandlung von Lungenkrebs bereitgestellt werden; und Faktor VIII kann zur Behandlung der Hämophilie vom Typ B bereitgestellt werden. Siehe z. B. Thompson, L., Science, 1992, 258, 744–746.

[0096] Antisense-Peptide und Antisense-Oligonucleotide können zum Zwecke der topischen oder subkutanen Anwendung und Zufuhr zu einem ausgewählten Gewebe verwendet werden. So kann beispielsweise die Antisense-Sequenz zum basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) zur Behandlung von Cheloiden in einem ausgewählten Gewebe verwendet werden. Antisense-Peptide, welche die Kaskadenreaktion von endogenen Cytokinen, welche bei Entzündungsreaktionen involviert sind, deaktivieren, d. h. ausschalten, sind ein weiteres Beispiel für eine topische oder subkutane Medikamentenzufuhr im Rahmen der vorliegenden Erfindung. Andere Anwendungen für topisch oder subkutan angewendete, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen und Schaum umfassen z. B. die Anwendung des Gens, welches die Melanocyten-stimulierende Hormonaktivität codiert, zur Behandlung von Hautstörungen, welche Hypopigmentierung involvieren, wie z. B. Vitiligo oder Albinismus. Alternativ kann eine topische oder subkutane Anwendung des Gens, welches die Melanin-konzentrierende Hormonaktivität codiert, zur Behandlung von Erkrankungen, welche Hyperpigmentierung involvieren, verwendet werden, wie z. B. bei "Cafe Aulait"-Flecken oder zur Entfernung von hyperpigmentierten Gebieten eines ausgewählten Gewebes wie z. B. "Muttermalen" oder "Schönheitsflecken".

[0097] Darüber hinaus können Peptid-Analoga mit entweder Membran-aufspannenden Fähigkeiten oder porenbildende Peptide wie z. B. Cyclosporin und Neomycin in die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen zur topischen oder subkutanen Anwendung von sowohl antibiotischen Salben als auch immunsuppressiven Mitteln inkorporiert werden. Gleichermaßen können Peptide mit N-terminalen aliphatischen oder cyclischen Acylketten verwendet werden, um die Zufuhr von anderen Peptiden oder Wirkstoffen zu verbessern. Darüber hinaus können an den Seitenketten acylierte Analoga oder N-Methyl-aminosäurenanaloga ebenfalls in diese Peptide inkorporiert werden, um sie lipophiler zu machen und dadurch die Medikamentenzufuhr zu erleichtern.

[0098] Noch weitere Anwendungen der topisch oder subkutan angewendeten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen umfassen die topische oder subkutane Zufuhr von Chelatbildnern und chelatbildenden Mitteln, um verschiedene Krankheitszustände zu behandeln, welche auf eine Behandlung mit Chelatbildnern ansprechen, wie z. B. Psoriasis und Psoriasis-Läsionen sowie der Wilson-Erkrankung. Geeignete Chelatbildner und chelatbildende Mittel umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein: Penicillamin; Citrat; Ascorbat; Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), sowie Derivate und Salze davon; Dihydroxypropylethylendiamin (DPEA), sowie Derivate und Salze davon; Cyclohexandiamintetraessigsäure (CHTA), sowie Derivate und Salze davon; Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), sowie Derivate und Salze davon; Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), sowie Derivate und Salze davon; Etidronsäure (EHDP), sowie Derivate und Salze davon; Dimethylsulfoxid (DMSO), sowie Derivate und Salze davon; Dipyridoxylethylendiamindiacetatbisphosphat (DPDP), sowie Derivate und Salze davon; N,N'-(1,2-Ethandivinylbis(oxy-2,1-phenylen))bis(N-carboxymethyl) (BAPTA), sowie Derivate und Salze davon; Aminophenol-triessigsäure (APTRA), sowie Derivate und Salze davon; Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylendiamin (TPEN), sowie Derivate und Salze davon; 1,4,7,10-Tetraazacyclodecan (DOTA), sowie Derivate und Salze davon; sowie Cyanine und ihre Derivate.

[0099] Weiterhin können immunsuppressive Mittel oder entzündungshemmende Präparate in die mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung inkorporiert werden und topisch oder subkutan in der Nähe von Gelenken verwendet werden, um Schmerzen und Entzündungen sowie andere Symptome zu beherrschen, die von irgendeiner einer Anzahl von entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen wie z. B. arthritischen Erkrankungen wie z. B. rheumatischen Arthritis oder degenerativer Gelenkserkrankung bedingt sind.

[0100] Falls erwünscht, können mehr als ein therapeutisches Mittel unter Verwendung der Mikrokügelchen oder des Schaums der vorliegenden Erfindung angewendet werden. So kann beispielsweise ein einzelnes Mikrokügelchen mehr als ein therapeutisches Mittel enthalten, oder Mikrokügelchen, welche verschiedene the-

rapeutische Mittel enthalten, können gemeinsam verabreicht werden. Beispielsweise können ein monoklonaler Antikörper, welcher an ein Melanom-Antigen binden kann, sowie ein Oligonucleotid, welches zumindest einen Teil des IL-2 codiert, gleichzeitig verabreicht werden. Der Ausdruck "zumindest einen Teil des", welcher hier verwendet wird, bedeutet, dass nicht das gesamte Gen von dem Oligonucleotid repräsentiert zu sein braucht, solange der Teil des repräsentierten Gens eine wirksame Blockade der Genexpression ermöglicht.

– Medikamentenvorläufer bzw. Prodrugs

[0101] Ähnlichermaßen können Medikamentenvorläufer in den Mikrokügelchen verkapselt werden und sind im Umfang des hier vennrendeten Begriffs therapeutisches Mittel umfasst. Medikamentenvorläufer (prodrugs) sind im Stand der Technik wohlbekannt und umfassen inaktive Medikamentenvorläufer, welche, wenn sie einer hohen Temperatur oder einem unterschiedlichen pH-Wert, metabolisierenden Enzymen, Kavitation und/oder Druck in Anwesenheit oder Abwesenheit von Sauerstoff ausgesetzt werden oder von den Mikrokügelchen freigesetzt werden, aktive Medikamente bilden. Solche Medikamentenvorläufer können von den mit Gas gefüllten Mikrokügelchen im erfindungsgemäßen Verfahren bei Anwendung von Ultraschall oder Radiofrequenz/Mikrowellen-Energie auf die Medikamentenvorläufer enthaltenden Mikrokügelchen mit der resultierenden Kavitation, Erhitzung, Druck und/oder Freisetzung aus den Mikrokügelchen aktiviert bzw. daraus freigesetzt werden. Geeignete Medikamentenvorläufer werden sich dem Fachmann erschließen und sind z. B. bei Sinkula et al., J. Pharm. Sci. 1975, 64, 181–210 beschrieben; diese Lehre wird hier mittels Bezugnahme vollständig inkorporiert.

[0102] Medikamentenvorläufer können beispielsweise inaktive Formen der wirksamen therapeutischen Mittel umfassen, bei denen eine chemische Gruppe im Medikamentenvorläufer anwesend ist, welche diesen inaktiv werden lässt und/oder dem Medikament Löslichkeit oder irgendeine andere Eigenschaft verleiht. In dieser Form sind die Medikamentenvorläufer allgemein inaktiv, aber sobald die chemische Gruppe vom Medikamentenvorläufer mittels Hitze, pH-Änderung, Kavitation, Druck und/oder in der Umgebung vorhandenen Enzymen oder auf sonstige Art und Weise abgespalten worden ist, ist das aktive Medikament erzeugt. Solche Medikamentenvorläufer sind im Stand der Technik ausführlich beschrieben und umfassen eine große Vielzahl von an chemische Gruppen gebundenen Medikamenten, wie z. B. durch Esterbindungen an kurzkettige, mittelkettige oder langkettige aliphatische Carbonate, Hemiester von organischem Phosphat, Pyrophosphat, Sulfat, Amide, Aminosäuren, Azoverbindungen, Carbamat, Phosphamid, Glucosiduronat, N-Acetylglucosamin und β-Glucosid.

[0103] Beispiele von therapeutischen Mitteln mit dem Stammmolekül und der reversiblen Modifikation oder Bindung sind die folgenden: Convallatoxin mit Ketalen, Hydantoin mit Alkylestern, Chlorphenesin mit Glycin- oder Alaninestern, Acetaminophen mit Koffein-Komplex, Acetylsalicylsäure mit THAM-Salz, Acetylsalicylsäure mit Acetaminophenylester, Naloxon mit Sulfatester, 15-Methylprostaglandin-$F_{2\alpha}$ mit Methylester, Procain mit Polyethylenglycol, Erythromycin mit Alkylestern, Clindamycin mit Alkylestern oder Phosphatestern, Tetracyclin mit Betainsalzen, 7-Acylaminocephalosporine mit Ring-substituierten Acyloxybenzylestern, Nandrolon mit Phenylpropionat-decanoatestem, Estradiol mit Enoletheracetal, Methylprednisolon mit Acetatestem, Testosteron mit n-Acetylglucosaminidglucosiduronat(trimethylsilyl)ether, Cortison oder Prednisolon oder Dexamethason mit 21-Phosphatestern.

[0104] Medikamentenvorläufer können auch als reversible Medikamentenderivate konstruiert werden und können als Modifikationsmittel zur Verbesserung des Medikamententransports an Wirkort-spezifische Gewebe verwendet werden. Beispiele von Stammmolekülen mit reversiblen Modifikationen oder Bindungen, um den Transport an ein Wirkort-spezifisches Gewebe zu beeinflussen und für einen verbesserten therapeutischen Effekt umfassen Isocyanat mit Haloalkylnitrosharnstoft, Testosteron mit Propionatester, Methotrexat(3-5'-dichlormethrotrexat) mit Dialkylestern, Cytosinarabinosid mit 5'-Acylat, Stickstofflost (2,2'-Dichlor-N-methyldiethylamin), Stickstofflost mit Aminomethyltetracyclin, Stickstofflost mit Cholesterin oder Estradiol oder Dehydroepiandrosteron-Estern und Stickstoff-Senföl mit Azobenzol.

[0105] Wie der Fachmann erkennen kann, kann eine spezielle chemische Gruppe zur Modifikation eines gegebenen therapeutischen Mittels ausgewählt werden, um die Verteilung des therapeutischen Mittels in der äußeren Haut bzw. Membran des Mikrokügelchens oder dem Innenraum bzw. Leerraum des Mikrokügelchens zu beeinflussen. Die Bindung, welche ausgewählt wird, um die chemische Gruppe an das therapeutische Mittel zu binden, kann so ausgewählt werden, dass sie die gewünschte Metabolismusgeschwindigkeit z. B. mittels Hydrolyse im Falle von Esterbindungen in Anwesenheit von Serumesterasen nach der Freisetzung aus den mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen aufweist. Darüber hinaus kann eine bestimmte chemische Gruppe ausgewählt werden, um die biologische Verteilung des eingesetzten therapeutischen Mittels in dem mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten, therapeutisches Mittel enthaltendem Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung zu beeinflussen, beispielsweise N,N-bis(2-Chlorethyl)phosphordiamidsäure mit cyclischem Phosphoramid für Eierstock-Adenokarzinome.

[0106] Darüber hinaus können die Medikamentenvorläufer, welche in den mit Gas oder gasförmigen Vorstu-

fen gefüllten Mikrokügelchen eingesetzt werden, so konstruiert werden, dass sie bestimmte reversible Derivate enthalten, welche verwendet werden, um die Wirksamkeitsdauer zu modifizieren, um eine verlängerte Wirkung oder eine Depotwirkung zu ergeben. So kann beispielsweise Nikotinsäure mit Dextran und Carboxymethyldextranestern modifiziert werden, Streptomycin mit Alginsäuresalz, Dihydrostreptomycin mit Parnoatsalz, Cytarabin (ara-C) mit 5'-Adamantoatester, ara-Adenosin (ara-A) mit 5'-Palmitat- und 5'-Benzoatestern, Amphotencin B mit Methylestern, Testosteron mit 17-β-Alkylestern, Estradiol mit Formiatester, Prostaglandin mit 2-(4-Imidazolyl)ethylaminsalz, Dopamin mit Aminosäurenamiden, Chloramphenicol mit Mono- und Bis-(trimethylsilyl)ethern und Cycloguanil mit Parnoatsalz. In dieser Form kann ein Depot oder Reservoir eines lange wirksamen Medikament in vivo aus den mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten, Medikamentenvorläufer enthaltenden Mikrokügelchen freigesetzt werden.

[0107] Zusätzlich können die in den mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen eingesetzten Medikamentenvorläufer so konstruiert werden, dass sie reversible Derivate enthalten, welche als Modifizierungsmittel für die Wirkdauer verwendet werden, um Depotwirkungseffekte zu ermöglichen oder zu verlängern. So kann beispielsweise Nikotinsäure mit Dextran und Carboxymethyldextranestern modifiziert werden, Streptomycin mit Alginsäuresalz, Dihydrostreptomycin mit Palmoatsalz, Cytarabin (ara-C) mit 5'-Adamantoatester, ara-Adenosin (ara-A) mit 5-Palmitat- und 5'-Benzoatestern, Amphotericin B mit Methylestern, Testosteron mit 17-β-Alkylestern, Estradiol mit Formiatester, Prostaglandin mit 2-(4-Imidazolyl)ethylaminsalz, Dopamin mit Aminosäurenamiden, Chloramphenicol mit Mono- und Bis-(trimethylsilyl)ethern und Cycloguanil mit Palmoatsalz. In dieser Form kann ein Depot oder Reservoir eines lange wirksamen Medikaments in vivo von den mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten, Medikamentenvorläufer enthaltenden Mikrokügelchen freigesetzt werden.

[0108] Zusätzlich können Verbindungen, welche allgemein thermisch labil sind, verwendet werden, um toxische freie Radikalverbindungen herzustellen, welche z. B. für die Chemotherapie nützlich sind. Verbindungen mit Azobindungen, Peroxid- und Disulfidbindungen, welche sich bei einer hohen Temperatur zersetzen, werden bevorzugt. Bei dieser Form des Medikamentenvorläufers werden die eine Azo-, Peroxid- oder Disulfidbindung enthaltenden Verbindungen mittels Kavitation und/oder verstärkter Erhitzung aktiviert, welche durch die Wechselwirkung von hochenergetischem Schall mit den mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen bewirkt wird, um Kaskaden an freien Radikalen aus diesen darin eingeschlossenen Medikamentenvorläufern zu bilden. Diese Medikamentenvorläufer können eine große Vielzahl von Medikamenten oder Chemikalien darstellen, wie z. B. Azoverbindungen, deren allgemeine Struktur R-N=N-R ist, wobei R eine Kohlenwasserstoffkette ist und die Doppelbindung zwischen den zwei Stickstoffatomen in vivo unter Bildung von freien Radikalprodukten reagieren kann.

[0109] Beispiele von Medikamenten oder Verbindungen, welche zur Herstellung von freien Radikalprodukten verwendet werden können, umfassen Aro-haltige Verbindungen wie z. B. Azobenzol, 2,2'-Azobisisobutyronitril, Azodicarbonamid, Azolitmin, Azomycin, Azosemid, Azosulfamid, Azoxybenzol, Aztreonam, Sudan III, Sulfachrysoidin, Sulfamidochrysoidin und Sulfasalazin, Verbindungen, welche Disulfidbindungen enthalten wie z. B. Sulbentin, Thiamindisulfid, Thiolutin, Thiram, Verbindungen, welche Peroxide enthalten, wie z. B. Wasserstoffperoxid und Benzoylperoxid, 2,2'-Azobisisobutyronitril, 2,2'-Azobis(2-amidopropan)dihydrochlorid und 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril).

[0110] Ein mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefülltes Mikrokügelchen, welches mit Sauerstoffgas gefüllt ist, sollte bei Kavitation extensive Mengen an freien Radikalen bilden. Darüber hinaus können auch Metallionen der Übergangsmetallserie, insbesondere Mangan, Eisen und Kupfer, die Geschwindigkeit der Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate aus Sauerstoff erhöhen. Durch Verkapselung von Metallionen innerhalb der Mikrokügelchen kann die Bildung von freien Radikalen in vivo erhöht werden. Diese Metallionen können in die Mikrokügelchen als freie Salze, als Komplexe, beispielsweise mit EDTA, DTPA, DOTA oder Desferrioxamin oder als Oxide der Metallionen inkorporiert werden. Zusätzlich können derivatisierte Komplexe der Metallionen an Lipid-Kopfgruppen gebunden werden, oder lipophile Komplexe der Ionen können beispielsweise in eine Lipid-Doppelschicht inkorporiert werden. Wenn diese einer thermischen Stimulierung wie z. B. mittels Kavitation ausgesetzt werden, erhöhen diese Metallionen die Geschwindigkeit der Bindung von reaktiven Sauerstoffintermediaten. Darüber hinaus können Radiosensibilisierungsmittel wie z. B. Metronidazol und Misonidazol in die mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen inkorporiert werden, um bei einer thermischen Stimulierung freie Radikale zu bilden.

[0111] Als Beispiel für die Verwendung von Medikamentenvorläufern kann eine acylierte chemische Gruppe über eine Esterbindung an ein Medikament gebunden werden, welche in vivo durch Enzymeinwirkung im Serum leicht gespalten wird. Der acylierte Medikamentenvorläufer wird in die mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten erfindungsgemäßen Mikrokügelchen inkorporiert. Die Derivate können zusätzlich zu Alkylgruppen aus Kohlenwasserstoffen und substituierten Kohlenwasserstoffen auch aus mit Halogen substituierten und Perhalogen-substituierten Gruppen wie z. B. Perfluoralkylgruppen bestehen. Perfluoralkylgruppen sollten die Fähigkeit besitzen, die Emulsion, aus welcher die Mikrokügelchen und der Schaum abgeleitet sind, zu stabilisieren. Wenn die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen durch den Schallimpuls des an-

gewendeten Ultraschalls aufgebrochen werden, wie weiter unten detailliert beschrieben wird, wird der durch die Mikrokügelchen verkapselte Medikamentenvorläufer anschließend dem Serum ausgesetzt. Die Esterverknüpfung wird anschließend durch im Serum enthaltene Esterasen gespalten, wobei das therapeutische Mittel erzeugt wird.

– Weitere Additive

[0112] Zusätzlich zu den Wirkstoffen wie z. B. therapeutischen Mitteln und kosmetischen Mitteln können zu den mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung zur topischen oder subkutanen Zufuhr zu einem ausgewählten Gewebe eines Patienten irgendeine oder mehrere einer Anzahl von zusätzlichen Zusammensetzungen zugegeben werden, welche die Wirksamkeit der Mikrokügelchen oder des darin enthaltenen Wirkstoffs günstig beeinflussen. Diese Zusammensetzungen können die Absorption des Wirkstoffs verbessern, die stabilisierten Mikrokügelchen und den Schaum konservieren oder eine gewünschte Farbe oder einen gewünschten Geruch beitragen. Eine Anzahl dieser Additive wird weiter unten detailliert beschrieben. Andere Additive, welche nicht erwähnt werden, würden sich dem Fachmann leicht erschließen, und ihre Aufnahme wird deshalb als Teil der vorliegenden Erfindung angesehen.

[0113] In den Mikrokügelchen können auch bakteriostatische Mittel umfasst sein, um eine bakterielle Zersetzung während der Lagerung zu verhindern. Geeignete bakteriostatische Mittel umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Benzalkoniumchlorid, Benzethoniumchlorid, Benzoesäure, Benzylalkohol, Butylparben, Cetylpyridiniumchlorid, Chlorbutanol, Chlorcresol, Methylparben, Phenol, Kaliumbenzoat, Kaliumsorbat, Natriumbenzoat und Sorbinsäure. Weiterhin können ein oder mehrere Antioxidationsmittel oder Sauerstofffänger in die mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen eingeschlossen werden, um die Oxidation des Lipids zu verhindern. Geeignete Antioxidationsmittel umfassen Tocoferol, Ascorbinsäure (Vitamin C) und Ascorbylpalmitat. Geeignete Sauerstofffänger umfassen Glucoseoxidase.

[0114] Ebenso können ein oder eine Anzahl von Konservierungsstoffen in die mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen-Präparate eingeschlossen werden. Derartige Konservierungsstoffe umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein: Parbene und quartäre Ammoniumverbindungen, verschiedene Alkohole wie z. B. Ethyl- und Isopropylalkohol, Phenole wie z. B. p-Chlor-m-cresol sowie ätherische Öle wie z. B. Citrusöl und Menthol.

[0115] Die vorstehend genannten bakteriostatischen Mittel, Antioxidantien und Sauerstofffänger sowie Konservierungsstoffe tragen zur Verlängerung der Lagerdauer der erfindungsgemäßen Mikrokügelchen-Schäume bei, welche ansonsten durch bakterielle Zersetzung, oxidative Wirkung oder andere Zersetzungsphänomene beeinträchtigt werden könnten.

[0116] Auch Säuren, alkalische Stoffe, Puffer und Neutralisierungsmittel können in den Formulierungen enthalten sein. Diese umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Verbindungen wie z. B.: Zitronensäure, Ammoniumcarbonat, Ammoniumhydrogencarbonat, Calciumcarbonat und Weinsäure. Im Allgemeinen werden die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen-Formulierungen bei einem pH-Wert zwischen 3,0 und 10,0 stabilisiert. Der gewünschte pH-Bereich beträgt von pH 4 bis pH 9, noch wünschenswerter bzw. bevorzugter zwischen pH 5 und pH 8. Der bevorzugteste pN-Wert beträgt zwischen pH 6,0 und pH 7,0.

[0117] Auch Mittel zur Kontrolle des Feuchtigkeitsgehalts bzw. Befeuchtungsmittel können umfasst sein, um die mit Gas bzw. gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen am Austrocknen zu hindern. Zusätzlich können Salbengrundlagen zusammen mit den mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen verwendet werden. Diese Salbengrundlagen können umfassen, ohne indessen in irgendeiner Weise darauf beschränkt zu sein: Lanolin, wasserfreies Lanolin, hydrophile Salbe, weiße Salbe, gelbe Salbe, Polyethylenglycol-Salbe, Petrolatum, hydrophiles Petrolatum, weißes Petrolatum, Rosenwasser-Salbe und Squalen. Suspendierungs- und/oder Viskositäts-steigernde Mittel können im Zusammenhang mit den mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen verwendet werden; diese können enthalten, ohne in irgendeiner Weise darauf beschränkt zu sein: Akazienöl, Agar, Alginsäure, Aluminiummonostearat, Bentonit, gereinigten Bentonit, Magma-Bentonit, Carbomer 934P, Carboxymethylcellulosecalcium, Carboxymethylcellulosenatrium 12, Carboxymethylcellulosenatrium, Carageen, mikrokristalline Cellulose, Dextrin, Gelatine, Guargummi, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Magnesiumaluminiumsilikat, Methylcellulose, Pektin, Polyethylenoxid, Polyvinylalkohol, Povidon, Propylenglycolalginat, Siliziumdioxid, Siliziumdioxid in colloidaler Form, Zinkoxid, Natriumalginat, Traganth und Xanthangummi. Weitere nützliche Mittel umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein: Glycerin, Hexylenglycol, Sorbitol und Polyethylenglycol. Zusätzlich kann es in einigen Fällen nützlich sein, eine übermäßige Feuchtigkeitsbildung in den Doppelschichten der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen zu verhindern. In diesem Falle kann Calciumsilikat zugesetzt werden. Andere Grundlagen und Festigungsmittel können ebenfalls verwendet werden. Diese können Kakaobutter, hartes Fett, hydriertes Rizinusöl, Cetostearylalkohol, Cetylalkohol, Cetylesterwachs, hartes Fett, Paraffin, Polyethylen-Exzipient, Stearylalkohol, emulgierendes Wachs, weißes Wachs und gelbes Wachs umfassen. Zusätzlich können die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen auch mit ölhal-

tigen Vehikeln kompatibel sein wie z. B. Mandelöl, Maisöl; Baumwollsamenöl, Ethyloleat, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, Mineralöl, leichtem Mineralöl, Myristylalkohol, Octyldodecanol, Olivenöl, Erdnussöl, Persic-Öl, Sesamöl, Sojaöl und Squalen.

[0118] Zur Anwendung von Kosmetika und im geringeren Ausmaß auch von therapeutischen Mitteln, insbesondere für topische Anwendungen, kann ein farbgebendes Mittel nützlich sein. Nützliche farbgebende Mittel umfassen: Violett 1, FD&C-Blau Nr. 1, FD&C-Grün Nr. 33 sowie FD&C-Rot Nr. 44. In kosmetischen Formulierungen der mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen können auch natürliche Farbstoffe verwendet werden; diese umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein: Alkanet, Annatto, Carotin, Chlorophyll, Cochinealrot, Safran und Gelbwurz.

[0119] In die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen-Formulierungen können Verarbeitungshilfsmittel inkorporiert werden, um die Glätte, das Volumen und die Gleichmäßigkeit des Präparats zu beeinflussen. Geeignete Mittel umfassen beispielsweise Natriumlaurylsulfat und Aluminiumoxidgel, Natriumsulfonat, Akazienöl und Schäumungsmittel wie z. B. Dodecylbenzolsuffonsäure.

[0120] Ein die Hautabsorption verbesserndes Mittel kann ebenfalls in die mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen oder in die wässrigen Medien, welche die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen-Strukturen umgeben, inkorporiert werden. Solche die Hautabsorption verbessernden Mittel umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, die folgenden: Pyrrolidone wie z. B. 2-Pyrrolidon, N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), 1-Methyl-2-pyrrolidon, 5-Methyl-2-pyrrolidon, 1-Ethyl-2-pyrrolidon, 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure, N-Hydroxyethylpyrrolidon (HEP), N-Cyclohexylpyrrolidon (CHP), N-Dimethylaminopropylpyrrolidon (DAPP), N-Cocoalkylpyrrolidon (CAP), N-Tallowalkylpyrrolidon (TAP), 1-Lauryl-2-pyrrolidon (LP) und 1-Hexyl-2-pyrrolidon (HP); Fettsäuren wie z. B. Ölsäure, Linolsäure, Heptansäure, Capronsäure, Laurinsäure, Stearinsäure, Octadecansäure, Palmitolsäure, Myristinsäure und Palmitelaidinsäure; Sulfoxide wie z. B. Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylacetamid (DMAC), Dimethylformamid (DMF), N-Methylformamid (NMF) und Decylmethylsulfoxid (DCMS); Amine und Derivate davon wie z. B. N,N-Diethyl-m-toluamid, Dodecylamin, ethoxyliertes Amin, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)oleylamin, Dodecyl-N,N-dimethylaminoacetat, Natriumpyroglutaminat und N-Hydroxylethalacetamid; Terpene und Terpenoide wie z. B. α-Pinene, δ-Limonen, 3-Caren, α-Terpineol, Terpinen-4-ol, Careol, Abisabolol, Carvon, Pulegon, Piperiton, Menthon, Fenchon, Cyclohexenoxid, Limonenoxid, Pinenoxid, Cyclopentenoxid, Ascaridol, 7-Oxabicyclo(2.2.1)heptan, 1,8-Cineol, Safrol, 1-Carvon, terpinoide Cyclohexanon-Derivate, acyclische Terpenkohlenwasserstoffketten, Kohlenwasserstoffterpene, cyclische Etherterpene, Cardamomsamenextrakt, Monoterpenterpineol und Acetylterpineol; ätherische Öle von Eukalyptus, Chenopodium und Yang Yaang; anionische Tenside: Natriumlaurylsulfat (SLS), Phenylsulfurat CA, Calciumdodecylbenzolsulfonat, Empicol ML26/F und Magnesiumlaurylsulfat; kationische Tenside: Cetyltrimethylammoniumbromid; nicht-ionische Tenside der synperonischen NP-Serie und der PE-Serie sowie Polysorbate; oder zwitterionisches N-Dodecyl-N,N-dimethylbetain; Alkohole wie z. B. Ethanol, Laurylalkohol, Linolenylalkohol, 1-Octanol, 1-Propanol und 1-Butanol; Harnstoff, cyclische ungesättigte Harnstoff-Analoga, Glycole, Azon, n-Alkanole, n-Alkane, Orgelase, Alphaderm-Creme sowie Wasser.

[0121] Diese können, brauchen aber nicht in einer Grundlage vorliegen, welche aus verschiedenen Substanzen bestehen kann, einschließlich, ohne darauf beschränkt zu sein, den folgenden: Glycerin, Propylenglycol (PG); Isopropylmyristat (IPM); Harnstoff in Polyethylenglycol, Ethanol und Wasser, sowie Polyethylenglycol (PEG).

[0122] Verschiedene Materialien, welche die Wirkstoffe umfassen, oder beliebige der verschiedenen Additive und anderen Materialien, welche erfindungsgemäß verwendet werden, können in den mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Innenraum der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, insbesondere Liposomen, während der Verwirbelung, Gaseinleitung oder anderen Verfahren zur Herstellung der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen inkorporiert werden, oder in die Wand oder auf die innere oder äußere Oberfläche des Lipids oder der Polymerverbindung, welche die Mikrokügelchen bildet. Eine Inkorporierung auf der äußeren Oberfläche der Mikrokügelchen wird bevorzugt. So können beispielsweise Wirkstoffe mit einem hohen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten direkt in eine Lipidschicht, welche das Gas umgibt, inkorporiert werden; indessen wird die Inkorporierung auf der äußeren Oberfläche der mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Lipid-Mikrokügelchen bevorzugt. Um dies zu erreichen, werden im Allgemeinen Gruppen, welche zur Bindung der Wirkstoffe geeignet sind, in die Lipidschichten inkorporiert und binden anschließend diese Materialien. Dies kann leicht durch die Verwendung von kationischen Lipiden oder kationischen Polymeren erreicht werden, welche in die getrockneten Lipid-Ausgangsmaterialien inkorporiert werden können. Die Inkorporierung dieser Wirkstoffe oder anderer Additive oder Materialien in das die Mikrokügelchen umgebende Milieu wird ebenfalls in Erwägung gezogen.

Verfahren zur Verabreichung und Verwendung

[0123] Die vorliegende Erfindung stellt eine topische bzw. subkutane Zufuhr von Wirkstoffen, insbesondere Medikamenten und Kosmetika, zu einem ausgewählten Gewebe eines Patienten, insbesondere der Haut, zur

Verfügung.

[0124] Während die topische Verabreichung gewöhnlich und vorwiegend an der Haut eines Patienten erfolgt, ist diese nicht darauf beschränkt, sondern umfasst die Verabreichung zu irgendwelchen und allen beliebigen internen oder externen Gewebeoberflächen eines Patienten. Daher umfassen zusätzlich zur Haut eines Patienten andere Orte der topischen Verabreichung verschiedene Schleimhäute wie z. B. die Schleimhäute des Auges, der Nase, des Rektums und der Vagina. Die Zufuhr zu den Orten der Gewebeoberflächen erfolgt lokal (das heißt, zum Ort der Anwendung), aber es kann auch eine weitere Zufuhr als Ergebnis einer Absorption und eines Transports zu anderen Geweben erfolgen, insbesondere die systemische Zufuhr über das Blut, ausgehend vom lokalen Ort der topischen Verabreichung.

[0125] Ähnlichermaßen wird die subkutane Verabreichung gewöhnlich und vorwiegend die Zufuhr unterhalb der Haut eines Patienten mittels Injektion oder dergleichen darstellen. Sie ist indessen nicht darauf beschränkt, sondern umfasst die Anwendung unterhalb irgendwelcher und aller beliebigen internen oder externen Gewebeoberflächen eines Patienten. Somit umfassen zusätzlich zur Verabreichung unterhalb der Haut eines Patienten andere Orte der subkutanen Verabreichung die Verabreichung unterhalb verschiedener Schleimhäute wie z. B. der Schleimhäute des Auges, der Nase, des Rektums und der Vagina. Die Zufuhr an diese Orte erfolgt lokal (das heißt, an den Ort der Anwendung), aber es kann auch eine weitere Zufuhr als Ergebnis einer Absorption und Weiterbeförderung zu anderen Geweben erfolgen, insbesondere die systemische Zufuhr über das Blut, ausgehend vom lokalen Ort der subkutanen Verabreichung. Es sollte insbesondere erwähnt werden, dass eine Absorption und eine Weiterbeförderung der therapeutischen und kosmetischen Mittel zu weiteren Geweben über längere Zeiträume durch die Verwendung von subkutanen Depot-Injektionen erreicht werden kann. Bei subkutanen Injektionen erfolgen die Injektionen allgemein typischerweise unmittelbar unterhalb der Gewebeoberfläche und sind allgemein nicht mehr als 3,0 cm tief. Die subkutanen Injektionen sind vorzugsweise zwischen etwa 0,05 mm und 1,0 cm tief, vorzugsweise zwischen etwa 0,1 mm und etwa 1 mm tief, weiter bevorzugt zwischen etwa 0,1 und etwa 0,5 mm tief und besonders bevorzugt ungefähr 0,2 mm tief.

[0126] Die Mikrokügelchen der Erfindung werden typischerweise und besonders bequem in Form von Schäumen verabreicht.

[0127] Eine besonders wichtige Ausführungsform der topischen und subkutanen Verabreichung der Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung stellt die Verwendung der Mikrokügelchen in transdermalen Zufuhrsystemen wie z. B. transdermalen Pflastern sowie bei der Bildung mittels Adsorption oder alternativ mittels subkutaner Injektion eines subkutanen Depots dar. Viele therapeutische Mittel werden im Magen-Darm-Trakt schlecht absorbiert und können bei einer oralen Verabreichung deshalb oft keine adäquaten systemischen Wirkstoffspiegel ergeben. Obwohl transdermale Pflaster bei der Zufuhr einiger therapeutischer Mittel wie z. B. Nikotin wirksam sind und unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mikrokügelchen eingesetzt werden können, ist dieser Ansatz bei der Zufuhr von größeren Molekülen wie z. B. Peptiden weniger wirksam. Bei Peptiden wie z. B. Antagonisten des das luteinisierende Hormon freisetzenden Hormons (LHRH) sowie Bombesin muss das therapeutische Mittel in Übereinstimmung mit dem Stand der Technik täglich verabreicht werden, was unweigerlich erfordert, dass der Patient erhebliche Schmerzen und Unwohlsein aufgrund der intramuskulären Injektionen erleidet.

[0128] Einen signifikanten Vorteil der vorliegenden Erfindung stellt daher die Schaffung eines alternativen Verabreichungswegs dar, welcher oft die Häufigkeit der Dosierung auf einmal monatlich oder weniger reduziert. Wie in **Fig.** 1 gezeigt wird, welche die äußere und innere Oberflächen der Haut eines Patienten darstellt, werden mit Gas gefüllte Mikrokügelchen (**1**) gezeigt, welche ein therapeutisches Mittel (**2**) umfassen und subkutan mittels Injektion mit einer Nadel (**3**) verabreicht werden, was zu einem subkutanen Depot in der Nähe eines Blutgefäßes (**4**) führt, wobei ein Teil des therapeutischen Mittels in den Blutstrom eintritt. In **Fig.** 1 ist das therapeutische Mittel (**2**) im Zwischenraum zwischen den Mikrokügelchen gefangen, es könnte aber auch, falls dies erwünscht ist, im Innenraum der einzelnen Mikrokügelchen vorliegen oder in einer an die einzelnen Mikrokügelchen gebundenen Form. Die therapeutischen Mittel können innerhalb der die Mikrokügelchen umgebenden Membranen vorliegen, z. B. innerhalb der Lipid-Mono- oder -Doppelschichten, an die Oberfläche der Mikrokügelchen gebunden oder adsorbiert sein wie z. B. durch eine kovalente Bindung oder durch eine van der Waals- oder elektrostatische Wechselwirkung, oder einfach in den dünnen wässrigen Bereichen gefunden werden, welche die Mikrokügelchen, die den stabilisierten Schaum darstellen, umgeben. In jedem Falle fungieren die Mikrokügelchen selbst sowie der Schaum, welchen sie in ihrer Gesamtheit ausmachen, als Barrieren gegenüber einer ungehinderten Diffusion des therapeutischen Mittels. Als solche fungieren die Mikrokügelchen und der Schaum als bequemes Zufuhrvehikel zur subkutanen Verabreichung des Medikaments.

[0129] Bei herkömmlichen Zufuhrsystemen für therapeutische Mittel mit Depotwirkung werden die therapeutischen Mittel gewöhnlich in einer Polymermatrix wie z. B. Polymilchsäure oder Polymethacrylat eingebettet. Siehe z. B. Kost, J., Leong, K. und Langer, R., "Ultrasonic Modulated Drug Delivery Systems", Polymers in Medicine U, Plenum Press, New York und London, S. 387–396; sowie Brown, L., und Langer, R. "Transdermal Delivery of Drugs", Ann. Rev. Med., 1988, 39: 221–29. Obwohl im Hinblick auf die Entwicklung von Formulierungen mit Depotwirkung ein erheblicher Fortschritt erzielt wurde, gibt es immer noch signifikante Hindernisse.

Es ist schwierig, die gewünschten Freisetzungskinetiken wie z. B. die Freisetzung über einen Zeitraum von mehr als 30 Tagen für ein gegebenes therapeutisches Mittel zu erreichen. Zweitens kann das therapeutische Mittel während der normalerweise bei der Lagerung involvierten Zeiträume eine Zersetzung erleiden. Möglicherweise am Wichtigsten ist, dass es sehr schwierig war, Zufuhrsysteme mit Depotwirkung zu entwickeln, welche nicht toxisch sind, z. B., welche nicht zu einer lokalen Bildung von Granulomen oder zu anderen Gewebeschäden führen. Es war lange Zeit eine Aufgabe des Standes der Technik, ein Gleichgewicht zwischen biologischer Abbaubarkeit und Depotwirkung zu erreichen. Die vorliegende Erfindung stellt eine befriedigende Lösung dieser Probleme zur Verfügung. Die Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung ermöglichen es dem Fachmann, recht abbaubare und biokompatible Verbindungen wie z. B. Phospholipide und Polymere zu verwenden, die als Stabilisierungsverbindungen für das Gas oder die gasförmigen Vorstufen der Mikrokügelchen als Depots mit nachhaltiger Zufuhr zu verwenden. Insbesondere die Mikrokügelchen und Schäume, welche mit Perfluorkohlenwasserstoffen hergestellt werden, sind relativ stabil und als derartige Zufuhrsysteme nützlich.

[0130] Bei herkömmlichen Depots mit nachhaltiger Zufuhr beruhen die Freisetrungskinetiken für das therapeutische Mittel hauptsächlich auf der Zusammensetzung der die Nachhaltigkeit bewirkenden Polymermatrix sowie auf die Affinität des therapeutischen Mittels zur Polymermatrix. Bei der vorliegenden Erfindung beeinflusst nicht nur die Aufmachung der stabilisierenden Verbindung die Freisetzung des therapeutischen Mittels, sondern auch die Zusammensetzung des Gases, welches zur Verkapselung in den Mikrokügelchen ausgewählt wurde, spielt eine signifikante Rolle. Es wurde gefunden, dass relativ lösliche Gase zur Herstellung von stabilisierten Schäumen für eine rasche Zufuhr des therapeutischen Mittels verwendet werden können. Indessen werden sehr unlösliche Gase für eine nachhaltige Zufuhr des therapeutischen Mittels, z. B. eine Zufuhr über mehrere Wochen, bevorzugt. Allgemein zeigen bei einer gegebenen vergleichbaren stabilisierenden Verbindung, z. B., wenn Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) verwendet wird, die Mikrokügelchen und der Schaum, welche aus Luft, Stickstoff, Perfluormethan, Perfluorethan, Perfluorpropan, Perfluorbutan und Perfluorpentan hergestellt wurden, eine in dieser Reihenfolge ansteigende Stabilität, und die therapeutischen Mittel, welche darin eingeschlossen bzw. verkapselt sind, werden von den stabileren Mikrokügelchen und dem Schaum langsamer freigesetzt.

[0131] Die vorliegende Erfindung fügt somit eine mit den Zufuhrsystemen des Standes der Technik nicht erreichbare, einzigartige Fähigkeit hinzu. Im Stand der Technik konnte man lediglich die Freisetzung des therapeutischen oder kosmetischen Mittels mittels Veränderung der Zusammensetzung der stabilisierenden Matrix, aus welcher der Wirkstoff freigesetzt wurde, beeinflussen. Bei der vorliegenden Erfindung ist es möglich, nicht nur das Lipid und/oder Polymer, welches in den Mikrokügelchen eingesetzt werden soll, sondern auch das Gas auszuwählen und durch diese beiden Maßnahmen die gewünschte Stabilität der Mikrokügelchen und des Schaums zu schaffen und im Endergebnis geeignete Freisetzungskinetiken des Medikaments festzulegen. Wenn im Laufe der Zeit die stabilisierten Mikrokügelchen und der Schaum allmählich kollabieren und das Gas freigesetzt wird und wegdiffundiert, verschwindet es allmählich aus dem Körper des Patienten, und zwar vorwiegend über die Lunge. Die Gase sind vorzugsweise inert, und die verschiedenen stabilisierenden Verbindungen wie z. B. ein Phospholipid werden leicht metabolisiert. Die vorliegende Erfindung ist daher in der Lage, ein stabiles, sicheres subkutanes Depot (einschließlich intramuskulär oder intrahumoral, d. h. innerhalb des Knochenmarks) mit nachhaltiger Freisetzung zu schaffen, ohne dass die Toxizitätsprobleme auftreten, welche vorliegen, wenn Systeme nach dem Stand der Technik verwendet werden.

[0132] Die Mikrokügelchen und der Schaum der vorliegenden Erfindung können als subkutan verabreichte Depotvehikel mit nachhaltiger Freisetzung verwendet werden und sind in Übereinstimmung mit der hier vorliegenden detaillierten Beschreibung leicht zu praktizieren. Das interessierende therapeutische Mittel, z. B. ein bioaktives Peptid, wird in ein steriles Gefäß gegeben, welches zur Herstellung der Mikrokügelchen und des Schaums verwendet wird und die stabilisierende Verbindung sowie einen mit Gas gefüllten Kopfraum enthält. Das Gemisch wird innerhalb eines gewünschten Zeitraums, welcher typischerweise zwischen 30 Sekunden und 2 Minuten liegt, z. B. mit einer mechanischen Schüttelvorrichtung vom Typ Wig-L-Bug™ bewegt. Das Gemisch wird mit einer Spritre entnommen und anschließend in den Körper eines Patienten (in die subkutanen Gewebe) injiziert. Durch Variieren der Konzentration der stabilisierenden Verbindung, z. B. eines biokompatiblen Lipids, und durch Variieren des Typs des Gases oder der gasförmigen Vorstufe, welche zur Herstellung der Mikrokügelchen verwendet wird, können Depotformulierungen mit unterschiedlichen Freisetzungskinetiken erzeugt werden. Die vorliegende Erfindung weist den zusätzlichen Vorteil auf, dass Ultraschall oder eine andere Energieform an der Haut des Patienten angewendet werden kann, um das therapeutische Mittel zu aktivieren und aus dem Depot im subkutanen Gewebe oder in anderen Geweben, in denen das Depot lokalisiert ist, freizusetzen. Diese Technik wird bei diabetischen Patienten als besonders vielversprechend angesehen, bei denen Mikrokügelchen und Schaum, welche Insulin enthalten, unter Verwendung von transkutanem Ultraschall im Anschluss an Mahlzeiten und in Übereinstimmung mit dem Blutzuckerspiegel des Patienten aktiviert werden können. Indem die Mikrokügelchen und der Schaum der vorliegenden Erfindung auf diese Art und Weise verwendet werden, können subkutane Injektionen des Insulins oder anderer therapeutischer Mittel vermieden werden, und das Depot kann sowohl für eine nachhaltige Freisetzung als auch für eine durch Schall unterstütz-

te Freisetzung des Insulins oder eines anderen therapeutischen Mittels verwendet werden.

[0133] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist weiterhin insbesondere die topische Verabreichung zur Lunge umfasst, das heißt, zu den Bronchien, Bronchiolen und Alveolen. Für eine solche Verabreichung mittels Inhalierens in die Luftwege eines Patienten werden die mit Gas oder gasförmiger Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen und der daraus bestehende Schaum der vorliegenden Erfindung unter Verwendung eines kleine wässrige Teilchen erzeugenden Aerosol-Generators verabreicht, wie z. B. eines Collison-Verneblers, welcher durch Luft oder mit Sauerstoff angereicherte Luft zur Bildung der kleinen wässrigen Teilchen betrieben wird. Siehe z. B. Knight et al., US-Patent 5,049,388. Wie hier weiter beschrieben wird, werden die mit Gas oder gasförmiger Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen und der Schaum der vorliegenden Erfindung mittels Schüttelns bzw. Vermischens erzeugt. Dieses Schütteln kann stattfinden, bevor die Mikrokügelchen oder der Schaum in den Aerosol-Generator eingefüllt werden, oder der Aerosol-Generator kann als primäre oder ausschließliche Quelle für das Schütteln bzw. die Vermischung verwendet werden. Durch die Passage durch den Vernebler besteht die Tendenz, dass mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen einer in wünschenswerter Weise verringerten Größe gebildet werden, welche sich zum Eintritt in die Alveolen, d. h. den kleinsten Teil der Lunge, eignen.

[0134] Somit sind die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen für die Zufuhr von Wirkstoffen wie z. B. therapeutischen Mitteln zur Lunge gemäß der im Folgenden beschriebenen, die Lunge betreffenden Zufuhr nützlich. Wie in **Fig.** 2 dargestellt ist, führen herkömmliche Mikrokügelchen (**2**) sowie andere Aerosol-Zusammensetzungen die therapeutischen Mittel hauptsächlich zu den zentralen Bronchien und Luftwegen zu und erreichen nicht die terminalen Bronchiolen oder Alveolen. Die mit Gas gefüllten Mikrokügelchen und Wirkstoffe (**1**) können allgemein weiter in die Lunge zugeführt werden und erreichen die terminalen Bronchiolen oder Alveolen. Da herkömmliche Liposomen und Aerosol-Zusammensetzungen hauptsächlich mit Wasser gefüllt sind, stellen sie im Wesentlichen Wassertröpfchen dar, sind erheblich dichter als Luft und ihr Übergang in die Lunge ist auf die zentralen Luftwege limitiert. Es ist selbstverständlich wünschenswert, dass die therapeutischen Mittel die peripheren Luftwege erreichen, um Erkrankungen der Lunge zu behandeln, und auch die systemische Zufuhr von pharmazeutischen Wirkstoffen, z. B. von Insulin über die die Lunge betreffende Route, zu bewirken. Die Alveolen stellen eine solche Verabreichungsroute hauptsächlich deshalb dar, weil die Gesamtoberfläche der Alveolen viel größer als die der zentralen Luftwege ist und somit die Möglichkeit, dass die therapeutischen Mittel in den Blutstrom hineindiffundieren, stark erhöht ist. Es ist indessen erforderlich, dass die therapeutischen Mittel diesen kleinen Luftsäckchen zugeführt werden. Die Alveolen werden von dünnen Membranen umfasst und liegen den Kapillaren unmittelbar gegenüber. Indessen versagen herkömmliche Aerosole dabei, diesen am weitesten entfernten Teil der Lunge zu erreichen. Die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen und der Schaum sind indessen, da sie mit Gas gefüllt sind, wesentlich leichter und treiben somit (in der Luft) und werden schließlich wesentlich weiter in die Tiefen der Lunge inhaliert. Darüber hinaus können sogar Gase, welche leichter als Luft sind, wie z. B. Helium, ausgewählt werden, um zu bewirken, dass die Mikrokügelchen und der Schaum im Luftstrom während der Inhalation sogar noch weiter in die Lunge treiben. Die Mikrokügelchen und der Schaum der vorliegenden Erfindung, welche therapeutische Mittel enthalten, werden mittels Verneblern leicht zugeführt, und es besteht tatsächlich die Tendenz, dass sich bei diesem Verfahren der Verneblung die Größe der Mikrokügelchen noch weiter reduziert, so dass sehr kleine Mikrokügelchen von Submikrongröße erreicht werden können und die Zufuhr sogar noch wirksamer wird. Für Inhalationsgeräte und andere Zufuhrsysteme, welche eine verlängerte Lagerung erforderlich machen, können Gase wie z. B. Perfluorkohlenwasserstoffe verwendet werden. Für die meisten Anwendungen, bei denen die stabilisierende Verbindung und das therapeutische Mittel unmittelbar vor der Verabreichung zur Herstellung der Mikrokügelchen oder von Schaum geschüttelt bzw. vermischt werden, erweisen sich Luft oder Stickstoff als das Gas, welches die Mikrokügelchen füllt, als adäquat.

[0135] Gasförmige Vorstufen, welche in den erfindungsgemäßen Mikrokügelchen enthalten sind, können bei einer Aktivierung mittels Temperatur, Licht oder pH oder weiteren Eigenschaften der Gewebe eines Patienten, welchem diese verabreicht werden, einen Phasenübergang von einer in den Mikrokügelchen eingeschlossenen Flüssigkeit in einen gasförmigen Zustand eingehen, wobei sie unter Bildung der gasgefüllten Mikrokügelchen und von Schaum, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, expandieren. Somit ist diese gasförmige Vorstufe, mit der die Mikrokügelchen gefüllt sind, nicht lediglich eine gasförmige Vorstufe, sondern gewissermaßen auch eine "Schaum-Vorstufe" und kann verwendet werden, um im Wesentlichen als ein Schäumungsmittel zu fungieren, sobald sie mittels Verabreichung zu einem ausgewählten Gewebe eines Patienten, in welchem Faktoren wie Temperatur oder pH zur Bildung des Gases verwendet werden können, aktiviert wurde. So findet das bei diesem Aspekt der vorliegenden Erfindung involvierte Prinzip seine hauptsächliche Anwendung bei der Herstellung von Seifen, Gesichtscremes, Hautreinigungsmitteln, ölhaltigen Schäumen und vielen anderen kosmetischen Vehikeln und Formulierungen, welche topisch angewendet werden. Diese Schäumungsfaktoren stellen die zur Unterstützung der Reinigung eines ausgewählten Gewebes und ausgewählter Poren notwendigen Schaumbildung zur Verfügung.

[0136] So wird gemäß dieser besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur in

situ-Herstellung von mit Gas gefüllten Mikrokügelchen, welche einen Wirkstoff umfassen, auf einem ausgewählten Gewebe eines Patienten zur Verfügung gestellt, wobei das Verfahren die Schritte umfasst: (a) Herstellung von mit einer gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mittels Schüttelns bzw. Vermischens einer wässrigen Suspension eines Lipids in Anwesenheit einer oder mehrerer gasförmigen Vorstufen, welche Phasenübergänge von flüssigen in gasförmige Zustände eingehen, wahlweise in Anwesenheit eines Gases, wobei die mit der gasförmigen Vorstufe in flüssiger Phase gefüllten Mikrokügelchen gebildet werden, und wobei der besagte Wirkstoff entweder vor oder nach dem Schritt des Schüttelns bzw. Vermischens zugegeben wird; und (b) Anwendung der mit einer gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche im vorherigen Schritt hergestellt worden sind, an einem ausgewählten Gewebe eines Patienten, wobei die besagte gasförmige Vorstufe durch das Gewebe aktiviert wird, so dass sie einen Phasenübergang in eine gasförmige Phase eingeht. Die Mikrokügelchen werden zur Matrix, welche einen Schaum bildet. Wenn dieses Verfahren in Anwesenheit eines Gases durchgeführt wird, wird das Gas vorzugsweise Stickstoff sein. Es wird weiterhin bevorzugt, dass dieses Verfahren ein Verfahren ist, bei welchem die gasförmigen Vorstufen Phasenübergänge von flüssigen in gasförmige Zustände bei oder in der Nähe der normalen Körpertemperatur des Patienten eingehen und dadurch durch die

[0137] Temperatur der Haut des Patienten aktiviert werden, so dass sie auf dieser den Übergang zur gasförmigen Phase eingehen. Weiter bevorzugt ist dieses Verfahren ein solches, bei welchem das Patientengewebe die menschliche Haut darstellt, welche eine normale Temperatur von etwa 37 °C aufweist, und wobei die gasförmigen Vorstufen die Phasenübergänge von flüssigen in gasförmige Zustände bei oder in der Nähe von 37°C eingehen.

[0138] Das oben beschriebene Verfahren stellt auch einen integralen Bestandteil eines weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung dar, nämlich eines Verfahrens zur topischen Zufuhr eines Wirkstoffs zu einem ausgewählten Gewebe eines Patienten, welches die Schritte umfasst: (a) Anwendung an dem Gewebe des Patienten von mit einer gasförmigen Vorstufe gefülltem Mikrokügelchen, hergestellt mittels Schüttelns bzw. Vermischens einer wässrigen Suspension eines Lipids in Anwesenheit einer oder mehrerer gasförmigen Vorstufen, welche Phasenübergänge von flüssigen in gasförmige Zustände eingehen, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Gases, wobei die mit der gasförmigen Vorstufe in flüssiger Phase gefüllten Mikrokügelchen gebildet werden, wobei der besagte Wirkstoff entweder vor oder nach dem Schütteln bzw. Vermischen zugegeben wird; und (b) Ermöglichen, dass die besagte gasförmige Vorstufe von dem Gewebe des Patienten aktiviert wird, so dass sie einen Übergang in die Gasphase eingeht, wobei die resultierende Expansion mit Gas oder einer gasförmgen Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen ergibt, welche den besagten Wirkstoff enthalten; und (c) Bewegen der mit Gas oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche den besagten Wirkstoff enthalten, in das Gewebe des Patienten (z. B. über die Poren oder auf andere Art und Weise). Das Bewegen der Mikrokügelchen bzw. der Wirkstoffe in das Gewebe des Patienten wird normalerweise mittels Einreibens oder eines ähnlichen mechanischen Hineinbewegens der Mikrokügelchen oder deren Wirkstoffe in das Gewebe erreicht. Es liegt indessen ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung, den Mikrokügelchen einfach nur zu erlauben, auf einem ausgewählten Gewebe zu verbleiben, welches anschließend die Wirkstoffe, welche aus therapeutischen Mitteln und Kosmetika ausgewählt sind, über einen längeren Zeitraum zu absorbieren.

[0139] Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, liegt es ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung, auf die Notwendigkeit eines Wirkstoffs zu verzichten und die inhärenten Eigenschaften des Lipids, aus welchem die Mikrokügelchen und Schäume hergestellt sind, vorteilhaft anzuwenden, um gewünschte Eigenschaften auf ein ausgewähltes Gewebe eines Patienten zu übertragen, an welches die besagten Mikrokügelchen und der Schaum angewendet werden. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Verbesserung der konditionierenden Eigenschaften eines ausgewählten Gewebes eines Patienten, welches die topische Anwendung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen an dem besagten Gewebe umfasst, wobei das besagte Lipid die Haut konditionierende Eigenschaften (d. h. die Haut verbessernde Eigenschaften) besitzt, insbesondere feuchtigkeitsspendende, fettende und insgesamt die allgemeine Gesundheit verbessernde Eigenschaften.

[0140] Dieser Aspekt der vorliegenden Erfindung ist auch auf die Mikrokügelchen anwendbar, welche unter Verwendung der gasförmigen Vorstufen hergestellt werden, wie ebenfalls weiter oben beschrieben wurde. Somit umfasst die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung der konditionierenden Eigenschaften eines ausgewählten Gewebes eines Patienten wie z. B. der Haut, umfassend (a) die topische Anwendung an dem besagten Gewebe von mit einer gasförmigen Vorstufe gefülltem Mikrokügelchen, welches mittels Schüttelns einer wässrigen Suspension eines Lipids in Anwesenheit einer oder mehrerer gasförmigen Vorstufen hergestellt wurde, welche Phasenübergänge von flüssigen in gasförmige Zustände eingeht bzw. eingehen, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Gases, wobei die mit der gasförmigen Vorstufe im flüssigen Zustand gefüllten Mikrokügelchen gebildet werden; (b) Ermöglichen, dass die gasförmige Vorstufe vom besagten Gewebe des Patienten aktiviert wird, so dass sie einen Übergang in die Gasphase eingeht, wobei die resultierende Expansion mit Gas oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen ergibt; und (c) Bewegen der Mikrokügelchen in das Gewebe des Patienten, wobei das besagte Lipid das Gewebe konditionierende bzw. verbes-

sernde Eigenschaften aufweist, insbesondere feuchtigkeitsspendende und fettende Eigenschaften. Andere das Gewebe konditionierende Eigenschaften, deren positive Beeinflussung wünschenswert ist, sind das Gefühl und die Abwesenheit von Klebrigkeit.

[0141] Es liegt ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung, die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen auf freigelegte innere Gewebe anzuwenden, wie z. B. die Gewebe des Herzens während einer Operation am offenen Herzen. Darüber hinaus liegt es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, eine Depot-Route mit nachhaltiger Zufuhr mittels Verabreichung über eine Einwirkung auf interne Gewebe oder Absorption der Mikrokügelchen in das Gewebe zu verwenden. Alle derartigen in Betracht gezogenen Verwendungen sind im Begriff "topische Verabreichung", welcher hier verwendet wird, subsummiert.

[0142] In der vorliegenden Erfindung kann Ultraschall angewendet werden, um sowohl die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen aufzubrechen und um thermische Wirkungen zu erzielen, welche die Geschwindigkeit der chemischen Spaltung und der Freisetzung des aktiven therapeutischen Mittels aus dem Medikamentenvorläufer beschleunigen können. Das Aufbrechen der Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung sowie die Spaltung der Medikamentenvorläufer wird auf eine überraschend einfache Art und Weise durchgeführt, indem Ultraschall einer bestimmten Frequenz auf das Gebiet des Patienten angewendet wird, in welchem die Therapie erwünscht ist, nachdem die Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung in dieses Gebiet verabreicht worden sind oder auf andere Art und Weise dieses Gebiet erreicht haben. Falls Ultraschall bei einer Frequenz, welche der Peak-Resonanzfrequenz der das therapeutische Mittel enthaltenden, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen entspricht, angewendet wird, können die Mikrokügelchen aufbrechen und ihre Inhaltsstoffe freisetzen, und der Medikamentenvorläufer kann gespalten werden, wobei das aktive therapeutische Mittel aus dem Medikamentenvorläufer freigesetzt wird.

[0143] Die Peak-Resonanzfrequenz kann entweder in vivo oder in vitro bestimmt werden, aber sie wird vorzugsweise in vivo bestimmt, indem die Mikrokügelchen Ultraschall ausgesetzt werden, die Signale der reflektierten Resonanzfrequenz empfangen werden und das Spektrum der empfangenen Signale analysiert wird, um dessen Peak zu bestimmen, wobei herkömmliche Mittel eingesetzt werden. Der Peak, welcher so bestimmt worden ist, entspricht der Peak-Resonanzfrequenz bzw. fundamentalen Frequenz (erste harmonische Schwingung), wie er manchmal bezeichnet wird. Die zweite harmonische Schwingung (das heißt, das zweifache Vielfache der fundamentalen Frequenz) kann ebenfalls bestimmt werden.

[0144] Die Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung haben vorzugsweise eine Peak-Resonanzfrequenz von zwischen etwa 0,5 MHz und etwa 10 MHz. Selbstverständlich variiert die Peak-Resonanzfrequenz der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung in Abhängigkeit vom Außendurchmesser und in gewissem Maße der Elastizität bzw. Flexibilität der Mikrokügelchen, wobei größere und elastischere bzw. flexiblere Mikrokügelchen eine tiefere Resonanzfrequenz aufweisen als die kleineren und weniger elastischen bzw. flexiblen Mikrokügelchen.

[0145] Die ein therapeutisches Mittel enthaltenden, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen können ebenfalls aufbrechen, und die Medikamentenvorläufer können gespalten werden, wenn sie Ultraschall, welcher nicht der Peak-Resonanzfrequenz entspricht, in Kombination mit einer höheren Energie (Watt-Zahl) und Dauer (Zeit) ausgesetzt werden. Diese höhere Energie resultiert indessen in einer stark erhöhten Erhitzung, welche nicht wünschenswert sein kann. Durch Einstellung der Frequenz der Energie, so dass diese der Peak-Resonanzfrequenz entspricht, wird die Effektivität des Aufbrechens und des Freisetzens des therapeutischen Mittels verbessert und es findet allgemein keine merkliche Erhitzung des Gewebes statt (d.h. häufig keine Temperaturerhöhung von mehr als etwa 2°C), und es wird weniger Gesamtenergie benötigt. Somit wird die Anwendung von Ultraschal) bei der Peak-Resonanzfrequenz besonders bevorzugt, obwohl sie nicht erforderlich ist.

[0146] Es kann irgendeine diagnostische Ultraschall-Bildgebungsvorrichtung der verschiedenen Typen bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, wobei ein bestimmter Typ oder ein bestimmtes Modell dieser Vorrichtung beim Verfahren zur Durchführung der vorliegenden Erfindung nicht kritisch ist.

[0147] Weiterhin sind Vorrichtungen geeignet, welche zur Verabreichung von Ultraschall-Hyperthermie konstruiert sind, wie z. B. Vorrichtungen, die in den US-Patenten 4,620,546; 4,658,828; sowie 4,586,512 beschrieben sind, deren Lehren jeweils mittels Bezugnahme in ihrer Gesamtheit hier eingeschlossen sind. Vorzugsweise verwendet die Vorrichtung einen Resonanzfrequenz (RF)-Spektralanalysator. Die Wandlersonden können entweder extern angewendet oder implantiert werden. Der Ultraschall wird allgemein anfänglich bei einer niedrigeren Intensität und Zeitdauer angewendet; anschließend werden die Intensität, Zeit und/oder Resonanzfrequenz so lange erhöht, bis die Mikrokügelchen aufbrechen.

[0148] Obwohl sich die Anwendung der verschiedenen oben beschriebenen Prinzipien einem Fachmann leicht erschließt, wenn sie im Lichte der vorliegenden Erfindung betrachtet wird, wird als allgemeine Richtschnur bemerkt, dass bei mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten. Mikrokügelchen mit einem durchschnittlichen Außendurchmesser von etwa 1,5 bis etwa 10 Mikrometer die Resonanzfrequenz allgemein im Bereich von etwa 1 bis etwa 10 Megahertz liegt. Durch Einstellung des Brennpunktes auf die Mitte des Zielgewebes können die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen unter Echtreit-Bedingungen mit Ultra-

schall visualisiert werden, wie sie sich innerhalb des Zielgewebes akkumulieren. Unter Verwendung z. B. des kurvenförmigen Array-Wandlers bei 7,5 Megahertz, Einstellung der dem Wandler zugeführten Leistung auf ein Maximum und Einstellung des Brennpunktes innerhalb des Zielgewebes wird die räumliche temporale durchschnittliche Peak-Leistung (spatial peak temporal average power; SPTA) in Wasser ein Maximum von etwa 5,31 mW/cm^2 aufweisen. Diese Leistung wird eine geringfügige Freisetzung des therapeutischen Mittels aus den mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen bewirken, wobei eine sehr viel stärkere Freisetzung unter Verwendung einer höheren Leistung erreicht werden kann.

[0149] Wenn der Wandler in den Doppler-Modus geschaltet wird, sind bei demselben Wandler höhere Ausgangsleistungen bis zu 2,5 Watt pro cm^2 verfügbar. Wenn die Vorrichtung im Doppler-Modus betrieben wird, kann die Leistung einem ausgewählten Brennpunkt innerhalb des Zielgewebes zugeführt werden und die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen können zur Freisetzung ihrer

[0150] therapeutischen Mittel veranlasst werden. Eine Auswahl des Wandlers dahingehend, dass die Resonanzfrequenz der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen getroffen wird, macht dieses Verfahren der Freisetzung des therapeutischen Mittels sogar noch wirksamer.

[0151] Bei mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen eines größeren Durchmessers, z. B. größer als 3 Mikron mittlerer Außendurchmesser, kann ein Wandler mit geringerer Frequenz die Freisetzung des therapeutischen Mittels effektiver erreichen. So kann beispielsweise ein Wandler mit einer geringeren Frequenz von 3,5 Megahertz, z. B. ein kurvenförmiges Array-Modell von 20 mm, ausgewählt werden, um der Resonanzfrequenz der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen zu entsprechen. Bei Verwendung dieses Wandlers können 101,6 Milliwatt pro cm^2 zum Brennpunkt zugeführt werden, wobei ein Umschalten in den Doppler-Modus die Ausgabeleistung (SPTA) auf 1,02 Watt pro cm^2 erhöht.

[0152] Zur Anwendung des Phänomens der Kavitation zur Freisetzung und/oder Aktivierung der therapeutischen Mittel/Medikamentenvorläufer innerhalb der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen kann Energie einer niedrigeren Frequenz verwendet werden, da die Kavitation bei niedrigeren Frequenzen effektiver vonstatten geht. Unter Verwendung eines Wandlers von 0,757 Megahertz, welcher mit höheren Spannungen betrieben wird (bis zu 300 Volt) wird die Kavitation von Lösungen von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen bei Schwellenwerten von etwa 5,2 Atmosphären erfolgen.

[0153] Tabelle 3 zeigt die Energiebereiche, welche den Geweben in Form von diagnostischem Ultraschall auf gewöhnlich verwendeten Instrumenten zugeführt werden wie z. B. dem Piconics Inc. (Tyngsboro, MA) Portscan General purpose scanner mit einem Receiver Pulsen vom Typ 1966, Modell 661; dem Picker (Cleveland, OH) Echoview 8L Scanner unter Einschluss des 80C-Systems oder dem Medisonics (Mountain View, CA) Model D-9 Versatone Bidirectional Doppler. Im Allgemeinen sind diese Energiebereiche, welche bei der Pulswiederholung eingesetzt werden, zum Beobachten der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen nützlich, aber sie reichen nicht aus, um die Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung aufzubrechen.

TABELLE 3

Mittels diagnostischer Vorrichtungen erzeugte Leistung und Intensitäten *

Pulswiederholungs-frequenz (Hz)	Gesamte Ultraschall-Ausgangsleistung P (mW)	Durchschnittliche Intensität auf der Wandleroberfläche I_m (W/m²)
520	4,2	32
676	9,4	71
806	6,8	24
1000	14,4	51
1538	2,4	8,5

*Diese Werte sind Carson et al., *Ultrasound in Med. & Biol.* 1978, 3, 341-350, entnommen, dessen Offenbarung hier mittels Bezugnahme vollständig einbezogen wird.

[0154] Ultraschall höherer Energie, wie er gewöhnlich bei therapeutischen Ultraschallausrüstungen eingesetzt wird, wird für die Aktivierung der ein therapeutisches Mittel enthaltenden, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen bevorzugt. Allgemein werden in therapeutischen Ultraschallgeräten 50%-ige

bis 100%-ige Pulszyklen in Abhängigkeit von der Fläche des mit Ultraschall zu erhitzenden Gewebes eingesetzt. Gebiete mit größeren Muskelmassen (d. h. Rücken und Schenkel) und Gewebe mit einem hohen Anteil an Blutgefäßen wie z. B. das Herz können den größten Pulszyklus, z. B. 100%, erforderlich machen.

[0155] Bei diagnostischen Ultraschallanwendungen werden ein oder mehrere Schallpulse verwendet und die Maschine wartet zwischen den Pulsen, um die reflektierten Schallsignale zu empfangen. Die beschränkte Anzahl von Pulsen, welche bei diagnostischen Ultraschallanwendungen verwendet werden, limitiert die effektive Energie, welche dem abgebildeten Gewebe zugeführt wird.

[0156] Bei therapeutischen Ultraschallanwendungen wird Ultraschall mit kontinuierlicher Wellenform verwendet, um höhere Energiemengen zuzuführen. Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Mikrokügelchen kann die Schallenergie gepulst werden, aber Ultraschall mit kontinuierlicher Wellenform wird bevorzugt. Falls Pulse eingesetzt werden, wird der Schall vorzugsweise in Echo-Impulsfolgenlängen von jeweils mindestens etwa 8, vorzugsweise mindestens etwa 20 Impulsen gleichzeitig gepulst.

[0157] Es kann entweder Ultraschall einer festen Frequenz oder einer modulierten Frequenz verwendet werden. Eine feste Frequenz ist so definiert, dass die Frequenz der Schallwelle über die Zeit konstant ist. Eine modulierte Frequenz ist eine Frequenz, bei welcher sich die Frequenz der Welle über die Zeit ändert, beispielsweise von einer hohen Frequenz zu einer niedrigen Frequenz (PRICH) oder von einer niedrigen zu einer hohen Frequenz (CHIRP). So wird beispielsweise ein PRICH-Puls mit einer anfänglichen Frequenz der Schallenergie von 10 MHz auf 1 MHz heruntergeregelt, während die Leistung von 1 auf 5 Watt gesteigert wird. Fokussierter, frequenzmodulierter Ultraschall hoher Energie kann die Geschwindigkeit der lokalen Gasexpansion innerhalb der Mikrokügelchen und des Aufbrechens zur Ermöglichung der lokalen Zufuhr der therapeutischen Mittel erhöhen.

[0158] Die Frequenz des verwendeten Schalls kann von etwa 0,025 bis etwa 100 Megahertz variieren. Frequenzbereiche zwischen etwa 0,75 und etwa 3 Megahertz werden bevorzugt und Frequenzen zwischen etwa 1 und etwa 2 Megahertz werden besonders bevorzugt. Die üblicherweise verwendeten therapeutischen Frequenzen von etwa 0,75 bis etwa 1,5 Megahertz können eingesetzt werden. Ebenfalls können die üblicherweise verwendeten diagnostischen Frequenzen von etwa 3 bis etwa 7,5 Megahertz eingesetzt werden. Im Falle von sehr kleinen Mikrokügelchen, beispielsweise von weniger als 0,5 Mikron mittlerem Außendurchmesser können höhere Schallfrequenzen bevorzugt werden, da diese kleineren Mikrokügelchen Schallenergie bei höheren Schallfrequenzen effektiver absorbieren. Wenn sehr hohe Frequenzen verwendet werden, z. B. von mehr als 10 Megahertz, weist die Schallenergie allgemein eine begrenzte Eindringtiefe in Flüssigkeiten und Gewebe auf. Es wird eine äußerliche Anwendung für die Haut und andere oberflächliche Gewebe bevorzugt.

[0159] Obwohl die Verwendung von Ultraschall als Mittel zum Aufbrechen oder anderweitigem Deformieren der Mikrokügelchen und des Schaums der vorliegenden Erfindung, um dadurch die Freisetzung des darin enthaltenen Wirkstoffs, insbesondere eines therapeutischen Mittels, zu bewirken, eine bevorzugte Ausführungsform darstellt, wird der Fachmann im Lichte der vorliegenden Offenbarung erkennen, dass andere Mittel und Energieformen zum Erreichen desselben Ziels eingesetzt werden können. So können beispielsweise Mikrowellen und andere Formen von Radiofrequenzenergie, magnetische Induktion oszillierende Energie sowie Lichtenergie in ihren verschiedenen Formen eingesetzt werden, um die Freisetzung des Wirkstoffs aus den Mikrokügelchen und dem Schaum der vorliegenden Erfindung zu induzieren.

[0160] Wenn mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen zur Zufuhr des Wirkstoffs verwendet werden, kann der zuzuführende Wirkstoff innerhalb der Wand des Mikrokügelchens eingebettet sein, im Mikrokügelchen verkapselt sein und/oder an die innere oder äußere Wand des Mikrokügelchens angeheftet sein, je nachdem, was gewünscht wird. Der Wirkstoff kann auch im Milieu gefunden werden, welches die Mikrokügelchen umgibt. Der Ausdruck "angeheftet an" oder Abwandlungen davon, welcher hier im Zusammenhang mit dem Ort des Wirkstoffs verwendet wird, bedeutet, dass der Wirkstoff auf irgendeine Art und Weise an die Innenseite und/oder die Außenseite der Wand des Mikrokügelchens gebunden ist, beispielsweise durch eine kovalente oder ionische Bindung oder andere Formen der chemischen oder elektrochemischen Verknüpfung oder Wechselwirkung. Der Begriff "verkapselt in Abwandlungen davon", welcher hier im Zusammenhang mit dem Ort des Wirkstoffs verwendet wird, bezeichnet die Tatsache, dass der Wirkstoff in inneren Hohlraum des Mikrokügelchens angeordnet ist. Der Begriff "darin eingebettet" oder Abwandlungen davon, welcher hier im Zusammenhang mit dem Ort des Wirkstoffs verwendet wird, gibt die Position des Wirkstoffs innerhalb der Wand des Mikrokügelchens an. Der Begriff "in Mischung mit", welcher hier im Zusammenhang mit dem Wirkstoff verwendet wird, gibt an, dass der Wirkstoff im Milieu, welches die Mikrokügelchen umgibt, angeordnet ist, aber nicht an diese angeheftet ist. Der Begriff "einen Wirkstoff umfassend" bezeichnet alle der verschiedenen Typen von Anordnungen des Wirkstoffs im Zusammenhang mit den Mikrokügelchen. So kann der Wirkstoff variabel angeordnet sein, wie z. B. im inneren Hohlraum des mit Gas oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchens eingeschlossen sein, zwischen dem Gas oder der gasförmigen Vorstufe und der Innenwand des mit Gas oder der gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchens angeordnet sein, auf der äußeren Oberfläche des mit Gas oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchens inkorporiert sein und/oder innerhalb der Struktur des Mikrokügelchens selbst eingebettet sein. Er kann auch im umgebenden Milieu gefunden

werden.

[0161] Falls gewünscht, kann mehr als ein Wirkstoff unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mikrokügelchen und des Schaums angewendet werden. So kann beispielsweise ein einzelnes Mikrokügelchen mehr als einen Wirkstoff enthalten, oder es können Mikrokügelchen, welche verschiedene Wirkstoffe enthalten, zusammen verabreicht werden. Ähnlichermaßen können Medikamentenvorläufer in den Mikrokügelchen verkapselt sein und sind durch die Begriffe Wirkstoff bzw. therapeutisches Mittel, welche hier verwendet werden, umfasst.

[0162] In den mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung kann irgendeiner einer Vielzahl von Wirkstoffen zusätzlich zu den oben erwähnten verkapselt werden.

[0163] Die Mikrokügelchen und der Schaum der vorliegenden Erfindung können einem Patienten topisch oder subkutan verabreicht werden. Bei dem Patienten kann es sich um ein Tier irgendeines Typs handeln, er ist vorzugsweise ein Wirbeltier, weiter bevorzugt ein Säugetier und am bevorzugtesten ein Mensch. Die zu verabreichende nützliche Dosierung variiert, wie ein Fachmann erkennen wird, in Abhängigkeit von Faktoren wie des Alters, der Größe und des Typs des Patienten, welchem die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verabreicht werden sollen, der Art und Weise, auf welche die Verabreichung erfolgen soll (topisch, subkutan; mit oder ohne Depot), der betreffenden therapeutischen, kosmetischen oder irgendeiner anderen beabsichtigten Anwendung und des gewünschten therapeutischen, kosmetischen oder sonstigen beabsichtigten Effekts. Sobald der Fachmann mit der vorangehenden Information ausgestattet ist, kann er leicht die Dosierungsmengen festlegen. Typischerweise wird die Dosierung bei niedrigeren, ja sogar homöopathischen Mengen begonnen und so lange erhöht, bis der gewünschte therapeutische, kosmetische oder sonstige Effekt erreicht ist.

[0164] Die stabilen, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen und Schäume der vorliegenden Erfindung weisen eine Anzahl von wünschenswerten Qualitäten zur Verwendung in Hautpflegeprodukten auf. Zunächst können sie aufgrund der Tatsache, dass sie mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllt sind, nützlich zum Schutz der therapeutischen Mittel, Kosmetika und sonstigen Materialien sein. Obwohl die Mikrokügelchen des Standes der Technik unter Stickstoff gelagert werden können, werden sie allgemein Gasen wie z. B. Sauerstoff ausgesetzt, wenn die Flasche geöffnet wird. Falls die therapeutischen Mittel oder sonstigen Mittel in den Mikrokügelchen leicht oxidiert werden, kann dies zur Zersetzung des Produktes und zum Verlust der Wirksamkeit führen. Da die Mikrokügelchen und der Schaum der vorliegenden Erfindung mit Gas gefüllt sind, kann ein spezifisches Gas ausgewählt werden, um die Zersetzung des Produktes zu minimieren. So werden beispielsweise mit Stickstoffgas gefüllte Mikrokügelchen allgemein zur topischen oder subkutanen Zufuhr von Verbindungen bevorzugt, welche ansonsten leicht oxidiert werden könnten. Mikrokügelchen und Schaum, welche mit Argon gefüllt sind, stellen auch eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar, da Argon schwerer als Luft ist und die Tendenz besteht, dass die Wanderung von Luft in die Mikrokügelchen verhindert wird, wobei die bereits beschriebenen Vorteile erreicht werden. Die Verwendung von Perfluorkohlenwasserstoffgas bzw. -gasen ist gleichermaßen vorteilhaft, da es sich herausgestellt hat, dass die unter Verwendung solcher Gase hergestellten Mikrokügelchen sehr viel länger haltbar sind und deutlich weniger stabilisierende Verbindung, z. B. ein biokompatibles Lipid, zur Stabilisierung des mit Gas gefüllten Mikrokügelchens benötigen. Zusätzlich können die Mikrokügelchen und der Schaum aus entgastem Wasser hergestellt werden, um Spurenkonzentrationen von Sauerstoff aus dem wässrigen Lösungsmittel zu entfernen, welches zur Herstellung der Mikrokügelchen und des Schaums verwendet wird.

Herstellungsverfahren

[0165] Die stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen und Schäume, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können nach einer Anzahl von geeigneten Verfahren hergestellt werden. Diese werden im Folgenden einzeln für den Fall, dass die Mikrokügelchen mit Gas gefüllt sind, und für den Fall, dass sie mit einer gasförmgen Vorstufe gefüllt sind, beschrieben, obwohl Mikrokügelchen, welche sowohl ein Gas als auch eine gasförmige Vorstufe aufweisen, ebenfalls Teil der vorliegenden Erfindung sind.

– Verwendung eines Gases

[0166] Eine bevorzugte Ausführungsform umfasst die Schritte des Schüttelns bzw. Vermischens einer wässrigen Lösung, welche eine stabilisierende Verbindung, vorzugsweise ein Lipid, enthält, in Anwesenheit eines Gases bei einer Temperatur unterhalb der Gel/Flüssigkeits-Kristallphasenübergangstemperatur des Lipids zur Bildung der mit Gas oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen. Der Begriff Schütteln bzw. Vermischen sowie Abwandlungen davon, welcher hier verwendet wird, bedeutet irgendeine Bewegung, welche eine wässrige Lösung derartig schüttelt, dass das Gas aus der lokalen Umgebung in die wässrige Lösung eingeführt wird. Das Schütteln muss mit hinreichender Kraft erfolgen, um zur Bildung von Mikrokügelchen, insbesondere stabilisierter Mikrokügelchen zu führen. Das Schütteln kann mittels Verwirbelung wie z. B. Wirbelbildung, mittels vertikaler oder mittels horizontaler Bewegung erfolgen. Verschiedene Bewegungstypen können

kombiniert werden. Auch kann das Schütteln durch Schütteln des Behälters erfolgen, welcher die wässrige Lipidlösung enthält, oder mittels Schüttelns der wässrigen Lösung im Behälter, ohne dass der Behälter selbst geschüttelt wird.

[0167] Darüber hinaus kann das Schütteln manuell oder mittels einer Maschine erfolgen. Mechanische Schüttelvorrichtungen, welche verwendet werden können, umfassen beispielsweise einen Schütteltisch wie z. B. einen VWR Scientific Schütteltisch (Cerritos, CA) oder einen WIG-L-Bug®-Schüttler von Crescent Dental Mfg. Ltd., Lyons, III., welcher, wie herausgefunden wurde, zu hervorragenden Ergebnissen führt. Es stellt eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar, dass bestimmte Arten des Schüttelns oder des Verwirbelns verwendet werden, um stabile Mikrokügelchen innerhalb eines bevorzugten Größenbereichs herzustellen. Schütteln wird bevorzugt, und es wird bevorzugt, dass dieses Schütteln unter Verwendung einer mechanischen Wig-L-Bug®-Schüttelvorrichtung durchgeführt wird. Gemäß dieser bevorzugten Methode wird es bevorzugt, dass eine reziproke Bewegung zur Herstellung der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen verwendet wird. Es wird sogar noch weiter bevorzugt, dass die Bewegung in Form eines Kreisbogens reziprok gestaltet wird. Es wird sogar noch weiter bevorzugt, dass die Bewegung in Form eines Kreisbogens zwischen etwa 2° und etwa 20° reziprok gestaltet wird, und weiter bevorzugt, dass der Kreisbogen zwischen etwa 5° und etwa 8° liegt. Am meisten wird es bevorzugt, dass die Bewegung zwischen etwa 6°und etwa 7° reziprok gestaltet wird, insbesondere etwa 6,5°. Es wird in Erwägung gezogen, dass die Geschwindigkeit der reziproken Bewegung sowie ihr Kreisbogen kritisch für die Festlegung der Menge und Größe der gebildeten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen ist. Es stellt eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar, dass die Anzahl der reziproken Schritte, das heißt, volle Oszillationszyklen, innerhalb des Bereichs von etwa 1000 bis etwa 20000 pro Minute liegt. Weiter bevorzugt liegt die Zahl der reziproken Schritte bzw. Oszillationen zwischen 2500 und 8000. Der Wig-L-Bug®, welcher oben angesprochen wurde, ist eine mechanische Schüttelvorrichtung, welche alle 10 Sekunden 2000 Kolbenstöße produziert, das heißt 6000 Oszillationen pro Minute. Selbstverständlich ist die Anzahl der Oszillationen von der Masse des zu bewegenden Inhalts abhängig, wobei die Anzahl an Oszillationen geringer ist, wenn die Masse größer ist.

[0168] Ein weiteres Mittel zur Bewirkung des Schüttelns umfasst die Wirkung eines unter hoher Geschwindigkeit oder unter hohem Druck ausgestoßenen Gases. Es ist auch verständlich, dass vorzugsweise bei einem größeren Volumen der wässrigen Lösung sich die Gesamtmenge an Kraft entsprechend erhöht. Heftiges Schütteln wird als zumindest 60 Schüttelbewegungen pro Minute definiert und wird bevorzugt. Eine Verwirbelung bei mindestens 60–300 Umdrehungen pro Minute wird weiter bevorzugt. Eine Verwirbelung bei 300–1800 Umdrehungen pro Minute wird am meisten bevorzugt. Die Bildung der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen beim Schütteln kann visuell festgestellt werden. Die Lipidkonzentration, welche benötigt wird, um ein gewünschtes Ausmaß an stabilisierten Mikrokügelchen zu bilden, hängt vom Typ des verwendeten Lipids ab und kann leicht mittels Routineversuchen ermittelt werden. So beträgt beispielsweise in bevorzugten Ausführungsformen die Konzentration von 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylcholin (DPPC), welches gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung zur Bildung der stabilisierten Mikrokügelchen verwendet wird, etwa 0,1 mg/ml bis etwa 30 mg/ml an Salzlösung, vorzugsweise von etwa 0,5 mg/ml bis 20 mg/ml an Salzlösung und am bevorzugtesten von etwa 1 mg/ml bis etwa 10 mg/ml an Salzlösung. Die Konzentration des Distearoylphosphatidylcholins (DSPC), welches in bevorzugten Ausführungsformen verwendet wird, beträgt etwa 0,1 mg/ml bis etwa 30 mg/ml an Salzlösung, weiter bevorzugt von etwa 0,5 mg/ml bis etwa 20 mg/ml an Salzlösung und am bevorzugtesten von etwa 1 mg/ml bis etwa 10 mg/ml an Salzlösung.

[0169] Zusätzlich zu den einfachen Schüttelverfahren, welche oben beschrieben werden, können aufwendigere, aber aus diesem Grunde weniger bevorzugte Verfahren ebenfalls eingesetzt werden, wie z. B. flüssigkristalline Schüttelungs-/Gaseinbringungsverfahren sowie Vakuumtrocknungs-Gaseinbringungsverfahren, wie sie z. B. in US Serien-Nr. 076,250, hinterlegt am 11. Juni 1993, beschrieben werden, welche hier in ihrer Gesamtheit mittels Bezugnahme inkorporiert wird. Falls derartige Verfahren verwendet werden, können die stabilisierten Mikrokügelchen, welche mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllt werden sollen, vor der Gaseinbringung unter Verwendung einer Vielzahl von herkömmlichen Liposomen-Herstellungsverfahren, welche sich dem Fachmann erschließen, hergestellt werden. Diese Verfahren umfassen Gefrier/Auftau-Techniken sowie Techniken wie z. B. Beschallung, Chelatdialyse, Homogenisierung, Lösungsmittelinfusion, Mikroemulgierung, spontane Bildung, Lösungsmittelverdampfung, French pressure cell-Technik, kontrollierte Tensiddialyse sowie andere Verfahren, welche jeweils die Herstellung der Mikrokügelchen auf verschiedene Arten in einer Lösung involvieren, welche den gewünschten Wirkstoff enthält, so dass das therapeutische, kosmetische oder sonstige Mittel in den resultierenden, auf polarem Lipid basierenden Mikrokügelchen verkapselt, eingebettet oder angeheftet wird. Siehe z. B. Madden et al., Chemistry and Physics of Lipids, 1990, 53, 37–46, deren Offenbarung hier mittels Bezugnahme vollständig inkorporiert wird.

[0170] Alternativ können die Wirkstoffe unter Verwendung von pH-Gradientenverfahren in die Mikrokügelchen geladen werden, welche, wie Fachleute erkennen werden, besonders auf Therapeutika oder Kosmetika anwendbar sind, welche bei einem bestimmten pH-Wert entweder proteinieren oder deproteinieren.

[0171] Die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche in Übereinstimmung mit den

oben beschriebenen Verfahren hergestellt werden, liegen im Größenbereich von weniger als ein Mikron bis über 100 μm. Darüber hinaus wird bemerkt werden, dass im Anschluss an die Extrusions- und Sterilisationsverfahren der Schritt des Bewegens bzw. Vermischens oder Schüttelns mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen ergibt, bei denen wenig oder keine verbleibende wasserfreie Lipidphase im Rückstand der Lösung vorliegt (Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. (1965), J. Mol. Biol. 13, 238–252). Die resultierenden mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen bleiben beim Lagern bei Raumtemperatur über ein Jahr oder sogar noch länger stabil.

[0172] Die Größe der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen kann, falls gewünscht, mit einer Vielzahl von Verfahren eingestellt werden, einschließlich Mikroemulgierung, Verwirbelung, Extrusion, Filtration, Beschallung, Homogenisierung, wiederholte Gefrier- und Auftauzyklen, Extrusion unter Druck durch Poren einer definierten Größe und ähnliche Verfahren. Es wird indessen allgemein am meisten bevorzugt, die Mikrokügelchen und den Schaum der vorliegenden Erfindung so zu verwenden, wie sie gebildet werden, wie im Folgenden beschrieben wird, ohne dass irgendeine Anstrengung darauf gerichtet wird, ihre Größe weiter zu modifizieren.

[0173] Die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen können durch ein einfaches Verfahren der Extrusion durch Filter in ihrer Größe festgelegt werden; die Größe der Filterporen kontrolliert die Größenverteilung der resultierenden, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen. Unter Verwendung von zwei oder mehreren in Kaskaden geschalteten Filtern, das heißt, einem hintereinander geschalteten Filtersatz von z. B. 10 μm, gefolgt von 8 μm, weisen die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen eine sehr enge Größenverteilung um einen Mittelpunkt von etwa 2–9 μm auf. Nach einer Filtration bleiben diese stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen über 24 Stunden lang stabil.

[0174] In bevorzugten Ausführungsformen wird die Lösung oder Suspension der stabilisierenden Verbindung durch einen Filter extrudiert, und die besagte Lösung oder Suspension wird vor dem Schütteln mit Hitze stabilisiert. Sobald die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen gebildet sind, können sie wie oben beschrieben zur Größeneinstellung filtriert werden. Diese vor der Bildung der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen durchgeführten Schritte bringen den Vorteil, dass beispielsweise die Menge von nicht-hydrierter stabilisierender Verbindung reduziert wird, und ergeben somit eine deutlich höhere Ausbeute an mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen und ergeben sterile mit Gas oder mit gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen, die für eine Verabreichung an einen Patienten bereit sind. So kann beispielsweise ein Mischungsgefäß wie z. B. ein Fläschchen oder eine Spritze mit einer gefilterten stabilisierenden Verbindung gefüllt werden, insbesondere einer Lipidsuspension, und die Suspension kann anschließend innerhalb des Mischungsgefäßes z. B. mittels Autoklavenbehandlung sterilisiert werden. In diese flüssige Suspension kann Gas eingebracht werden, um die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mittels Schüttelns des sterilen Gefäßes zu bilden. Das sterile Gefäß ist vorzugsweise mit einem Filter ausgestattet, welcher so angeordnet ist, dass die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen vor ihrem Kontakt mit dem Patienten durch den Filter hindurchtreten.

[0175] Der erste Schritt dieses bevorzugten Verfahrens, das heißt, die Extrusion der stabilisierenden Lösung, insbesondere der Lipidlösung, durch einen Filter, verringert die Menge an nicht-hydratisierter Verbindung, indem die getrocknete Verbindung aufgebrochen wird und eine größere Oberfläche zur Hydratisierung freigelegt wird. Der Filter weist vorzugsweise eine Porengröße von etwa 0,1 bis etwa 5 μm auf, weiter bevorzugt etwa 0,1 bis etwa 4 μm, noch weiter bevorzugt etwa 0,1 bis etwa 2 μm und am meisten bevorzugt etwa 1 μm. Unhydratisierte Verbindung, insbesondere ein Lipid, tritt als amorpher Klumpen von ungleichmäßiger Größe in Erscheinung und ist nicht erwünscht.

[0176] Der zweite Schritt, nämlich die Sterilisierung, ergibt eine Zusammensetzung, welche leicht einem Patienten verabreicht werden kann. Vorzugsweise wird die Sterilisierung mittels Hitzesterilisierung bewirkt, vorzugsweise mittels Autoklavenbehandlung der Lösung bei einer Temperatur von mindestens etwa 100°C, weiter bevorzugt mittels Autoklavenbehandlung bei etwa 100°C bis 130°C, sogar noch weiter bevorzugt etwa 110 bis etwa 130°C, und sogar noch weiter bevorzugt etwa 120°C bis etwa 130°C und am bevorzugtesten etwa 130°C. Vorzugsweise erfolgt das Erhitzen mindestens 1 Minute lang, weiter bevorzugt etwa 1 bis etwa 30 Minuten lang, sogar noch weiter bevorzugt etwa 10 bis etwa 20 Minuten lang und am meisten bevorzugt etwa 15 Minuten lang.

[0177] Falls erwünscht, kann alternativ die Abfolge des ersten und des zweiten Schritts, wie sie oben skizziert wurden, vertauscht werden, oder es kann lediglich einer der beiden Schritte eingesetzt werden.

[0178] Falls die Sterilisierung mit einem von der Hitzesterilisierung bei einer Temperatur, welche ein Aufbrechen der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen bewirken würde, abweichenden Verfahren vonstatten geht, kann die Sterilisierung vorzugsweise im Anschluss an die Bildung der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen vonstatten gehen. So kann beispielsweise Gammastrahlung vor und/oder nach der Bildung der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen eingesetzt werden.

[0179] Die Bildung der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen beim Schütteln kann an-

hand der Anwesenheit eines Schaums auf der wässrigen Lösung festgestellt werden. Dies ist mit einer Volumensverringerung der wässrigen Lösung bei der Schaumbildung gekoppelt. Das endgültige Volumen des Schaums beträgt vorzugsweise mindestens etwa das Vierfache des anfänglichen Volumens der wässrigen Lösung; es ist am meisten bevorzugt, dass die gesamte wässrige Lipidlösung in Schaum umgewandelt wird.

[0180] Die für das Schütteln erforderliche Zeitdauer kann mittels Feststellens der Schaumbildung bestimmt werden. So können beispielsweise 10 ml einer Lipidlösung in einem Zentrifugenröhrchen von 50 ml annähernd 15–20 Minuten lang verwirbelt werden. Zu diesem Zeitpunkt kann der Schaum bewirken, dass die Lösung, welche die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen enthält, bis zu einer Menge von 30 bis 35 ml ansteigt.

[0181] Die Lipidkonzentration, welche zur Bildung einer bevorzugten Schaummenge benötigt wird, schwankt in Abhängigkeit vom Typ des eingesetzten Lipids und kann leicht mittels Routineversuchen bestimmt werden. So beträgt bei bevorzugten Ausführungsformen die Konzentration an 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylcholin (DPPC), welche zur Bildung eines stabilisierten Schaums gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet wird, etwa 20 mg/ml bis etwa 30 mg/ml an Salzlösung, weiter bevorzugt von etwa 10 mg/ml bis etwa 20 mg/ml an Salzlösung und am meisten bevorzugt von etwa 1 mg/ml bis etwa 10 mg/ml an Salzlösung. Die Konzentration von Distearoylphosphatidylcholin (DSPC), welches in bevorzugten Ausführungsformen verwendet wird, beträgt etwa 20 mg/ml bis etwa 30 mg/ml an Salzlösung.

[0182] Genauer gesagt ergibt DPPC in einer Konzentration von 20 mg/ml bis 30 mg/ml beim Schütteln mit oder in Luft ein Gesamtvolumen an Suspension und eingeschlossenem Gas, welches viermal größer ist als das Volumen der Suspension allein. DSPC ergibt in einer Konzentration von 10 mg/ml beim Schütteln ein Gesamtvolumen, welches vollständig frei von irgendeiner flüssigen Suspension ist und in seiner Gesamtheit nur stabilisierten Schaum enthält. Ebenso können Perfluorkohlenwasserstoffe (PFCs) verwendet werden, um hohe Volumina an stabilisiertem Schaum zuo ergeben, wobei der Vorteil besteht, dass wesentlich weniger an stabilisierender Verbindung wie z. B. einem biokompatiblen Lipid zum Stabilisieren des Schaums verwendet wird. So wurde in einigen Fällen beispielsweise die Menge an benötigtem Lipid auf eine (1) bis zwei (2) Größenordnungen weniger geschätzt als anderenfalls der Fall wäre.

– Verwendung von gasförmigen Vorstufen

[0183] Zusätzlich zu den vorstehend genannten Ausführungsformen kann man auch gasförmige Vorstufen verwenden, welche in den Mikrokügelchen enthalten sind und die bei Aktivierung mittels Temperatur, Licht oder pH oder anderen Eigenschaften des Gewebes eines Patienten, welchem diese verabreicht werden, einen Phasenübergang von einer in den Mikrokügelchen eingeschlossenen Flüssigkeit zu einem Gaszustand eingehen können und unter Schaffung der stabilisierten, mit Gas gefüllten Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, expandieren. Diese Technik wird im Detail in den gleichzeitig anhängigen Patentanmeldungen mit den Seriennummern 160,232 und 159,687 beschrieben, welche beide am 30. November 1993 hinterlegt wurden und beide mittels Bezugnahme in ihrer Gesamtheit hier einbezogen werden.

[0184] Das bevorzugte Verfahren zur Aktivierung der gasförmigen Vorstufe erfolgt mittels Temperatur. Die Aktivierungs- oder Übergangstemperatur bzw. vergleichbare Ausdrücke bezeichnen den Siedepunkt der gasförmigen Vorstufe, d.h. die Temperatur, bei welcher der Flüssig/Gas-Phasenübergang der gasförmigen Vorstufe stattfindet. Nützliche gasförmige Vorstufen sind Gase, welche Siedepunkte im Bereich von etwa –100°C bis 70°C aufweisen. Die Aktivierungstemperatur ist eine besondere Eigenschaft einer jeden gasförmigen Vorstufe. Eine Aktivierungstemperatur von etwa 37°C bzw. der menschlichen Körpertemperatur wird für die gasförmigen Vorstufen der vorliegenden Erfindung bevorzugt. So wird eine flüssige gasförmige Vorstufe unter Bildung eines Gases bei 37°C aktiviert. Indessen kann die gasförmige Vorstufe in flüssiger oder gasförmiger Phase zur Verwendung in den efindungsgemäßen Verfahren vorliegen. Die Verfahren zur Herstellung der Mikrokügelchen oder des Schaums als topische oder subkutane Zufuhrmittel, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können unterhalb des Siedepunktes der gasförmigen Vorstufe durchgeführt werden, so dass eine Flüssigkeit in die Mikrokügelchen inkorporiert wird. Darüber hinaus können diese Verfahren am Siedepunkt der gasförmigen Vorstufe durchgeführt werden, so dass ein Gas in die Mikrokügelchen inkorporiert wird. Bei gasförmigen Vorstufen, welche niedrige Siedepunkte aufweisen, können die flüssigen Vorstufen unter Verwendung einer Mikrofluidisierungsvorrichtung, welche auf eine tiefe Temperatur abgekühlt ist, emulgiert werden. Die Siedepunkte können auch unter Verwendung von Lösungsmitteln in den flüssigen Medien gesenkt werden, um eine Vorstufe in flüssiger Form zu verwenden. Darüber hinaus können die Verfahren durchgeführt werden, indem die Temperatur während des Verfahrens erhöht wird, wobei das Verfahren mit einer gasförmigen Vorstufe als Flüssigkeit beginnt und mit einem Gas endet.

[0185] Die gasförmige Vorstufe kann so ausgewählt werden, dass das Gas in situ im Zielgewebe bzw. Fluid gebildet wird, oder in vivo beim Eintritt in den Patienten oder das Tier, oder vor der Verwendung, während der Lagerung oder während der Herstellung. Die Verfahren zur Herstellung der temperaturaktivierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen können bei einer Temperatur unterhalb des Siedepunkts der

gasförmigen Vorstufe durchgeführt werden. In dieser Ausführungsform wird die gasförmige Vorstufe in einem Mikrokügelchen eingeschlossen, so dass der Phasenübergang nicht während der Herstellung erfolgt. Stattdessen werden die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mit der gasfönnigen Vorstufe in flüssiger Phase hergestellt. Die Aktivierung des Phasenübergangs kann zu irgendeinem Zeitpunkt erfolgen, wenn der Temperatur gestattet wird, den Siedepunkt der Vorstufe zu übersteigen. Außerdem kann bei Kenntnis der Menge der Flüssigkeit in einem Tröpfchen der flüssigen gasförmigen Vorstufe die Größe des Mikrokügelchens beim Erreichen des gasförmigen Zustands bestimmt werden.

[0186] Alternativ können die gasförmigen Vorstufen verwendet werden, um stabile, mit Gas gefüllte Mikrokügelchen herzustellen, welche bereits vor ihrer Verwendung gebildet werden. In dieser Ausführungsform wird die gasförmige Vorstufe zu einem Behälter zugegeben, welcher ein Suspendierungs- und/oder Stabilisierungsmedium beinhaltet, und zwar bei einer Temperatur unterhalb der Flüssig/Gas-Phasenübergangstemperatur der betreffenden gasförmigen Vorstufe.

[0187] Wenn die Temperatur anschließend überschritten wird und eine Emulsion zwischen der gasförmigen Vorstufe und der flüssigen Lösung gebildet wird, geht die gasförmige Vorstufe einen Übergang vom flüssigen in den gasförmigen Zustand ein. Als Ergebnis dieses Erhitzens und der Gasbildung verdrängt das Gas die Luft im Kopfraum oberhalb der flüssigen Suspension, so dass mit Gas gefüllte Lipidkugeln gebildet werden, welche das Gas der gasförmigen Vorstufe oder Umgebungsgas (z. B. Luft) einschließen oder gleichzeitig die gasförmige Vorstufe im gasförmigen Zustand und Umgebungsluft einschließen. Dieser Phasenübergang kann zum optimalen Mischen und Stabilisieren des auf Mikrokügelchen basierenden Schaums verwendet werden. So kann beispielsweise die gasförmige Vorstufe Perfluorbutan in einem biokompatiblen Lipid oder einer anderen stabilisierenden Verbindung eingeschlossen werden, und wenn die Temperatur auf mehr als 4°C erhöht wird (der Siedepunkt von Perfluorbutan), resultiert daraus ein in der stabilisierenden Verbindung eingeschlossenes Perfluorbutangas. Als weiteres Beispiel kann die gasförmige Vorstufe Perfluorbutan in einer wässrigen Suspension, welche emulgierende und stabilisierende Verbindungen wie z.B. Glycerin oder Propylenglycol enthält, suspendiert und mit einer kommerziell erhältlichen Verwirbelungsvorrichtung verwirbelt werden. Die Verwirbelung wird bei einer Temperatur begonnen, die hinreichend niedrig ist, so dass die gasförmige Vorstufe flüssig ist, und wird fortgesetzt, während die Temperatur der Probe über die Phasenübergangstemperatur vom flüssigen in den gasförmigen Zustand erhöht wird. Wenn dies erfolgt, geht die Vorstufe während des Mikroemulgierungsverfahrens in den gasförmigen Zustand über. Bei Anwesenheit geeigneter Stabilisierungsmittel resultieren überraschenderweise stabile, mit Gas gefüllte Mikrokügelchen.

[0188] Dementsprechend können die gasförmigen Vorstufen so ausgewählt werden, dass sie in vivo mit Gas gefüllte Mikrokügelchen bilden, oder können so konstruiert werden, dass sie die mit Gas gefüllten Mikrokügelchen in situ, während des Herstellungsverfahrens, bei der Lagerung oder zu einem Zeitpunkt vor der Verwendung bilden.

[0189] Als weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die maximale Größe des Mikrobläschens, in dem der flüssige Zustand der gasförmigen Vorstufe in Form einer wässrigen Emulsion einer bekannten Größe zuvor gebildet und aufrechterhalten wird, unter Verwendung des idealen Gasgesetzes abgeschätzt werden, sobald der Übergang in den gasförmigen Zustand bewirkt wird. Zum Zwecke der Herstellung der mit Gas gefüllten Mikrokügelchen aus gasförmigen Vorstufen wird angenommen, dass die Gasphase sofort gebildet wird und dass das Gas im neu gebildeten Mikrokügelchen nicht aufgrund von Diffusion in die Flüssigkeit, welche im Allgemeinen eine wässrige Natur besitzt, abgereichert wurde. Somit wäre man in der Lage, aus einem bekannten Flüssigkeitsvolumen in der Emulsion die Obergrenze der Größe des mit Gas gefüllten Mikrokügelchens abzuschätzen.

[0190] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann eine Emulsion einer stabilisierenden Verbindung wie z. B. eines Lipids mit einer gasförmigen Vorstufe formuliert werden, welche flüssige Tröpfchen einer definierten Größe enthält, so dass beim Erreichen einer spezifischen Temperatur, nämlich des Siedepunkts der gasförmigen Vorstufe, die Tröpfchen in mit Gas gefüllte Mikrokügelchen einer definierten Größe expandieren. Diese definierte Größe stellt eine Obergrenze für die aktuelle Größe dar, da Faktoren wie z. B. die Gasdiffusion in die Lösung, der Verlust an Gas an die Atmosphäre und die Wirkung eines erhöhten Drucks Faktoren sind, für die das ideale Gasgesetz nicht verantwortlich ist.

[0191] Das ideale Gasgesetz und die Gleichung zur Berechnung des Volumenanstiegs der Gasbläschen bei einem Übergang vom flüssigen in den gasförmigen Zustand lautet wie folgt:

$$PV = nRT$$

wobei gilt
P = Druck in Atmosphären
V = Volumen in Litern
n = Anzahl der Mole des Gases
T = Temperatur in °K

R = Ideale Gaskonstante = 22,4 l Atmosphären $Grad^{-1}$ Mol^{-1}

[0192] Bei Kenntnis des Volumens, der Dichte und der Temperatur der Flüssigkeit in der flüssigen Emulsion kann die Menge (z. B. die Anzahl der Mole) der flüssigen Vorstufe sowie das Volumen der flüssigen Vorstufe im Voraus berechnet werden, welche bei einer Umwandlung in ein Gas in ein Mikrokügelchen eines bekannten Volumens expandieren werden. Das berechnete Volumen stellt eine Obergrenze der Größe des mit Gas gefüllten Mikrokügelchens dar, wobei sofortige Expansion in ein mit Gas gefülltes Mikrokügelchen und vernachlässigbare Diffusion des Gases im Lauf der Zeit der Expansion angenommen werden.

[0193] Somit kann bei der Stabilisierung der Vorstufe im flüssigen Zustand in einer Emulsion, in welcher die Tröpfchen der Vorstufe sphärisch sind, das Volumen des Vorstufentröpfchens anhand der Gleichung:

$$\text{Volumen (Kugel)} = 4/3\ \pi r^3$$

berechnet werden, wobei gilt:

r = Radius der Kugel.

[0194] Somit kann, sobald das Volumen vorhergesagt ist und die Dichte der Flüssigkeit bei einer gewünschten Temperatur bekannt ist, die Flüssigkeitsmenge (gasförmige Vorstufe) im Tröpfchen bestimmt werden. Genauer gesagt kann die folgende Gleichung angewendet werden:

$$V_{gas} = 4/3\ \pi(r_{gas})^3$$

wobei ein Einsetzen des idealen Gasgesetzes, nämlich

$$PV = nRT$$

zeigt, dass

$$V_{gas} = nRT/P_{gas}$$

oder

$$n = 4/3\ [\pi r_{gas}{}^3]P/RT \qquad (A)$$

das heißt $n = 4/3\ [\pi r_{gas}{}^3 P/RT]*MW_n$

[0195] Die Rückumwandlung in ein Flüssigvolumen

$$V_{liq} = [4/3\ [\pi r_{gas}{}^3]P/RT]*MW_n/D \qquad (B)$$

wobei D = die Dichte der Vorstufe ist.

[0196] Eine Auflösung der Gleichung nach dem Durchmesser des flüssigen Tröpfchens,

$$\text{Durchmesser}/2 = [3/4\pi[4/3*[\pi r_{gas}{}^3]P/RT]MW_n/D]^{1/3} \qquad (C)$$

,was sich auf

$$\text{Durchmesser} = 2[[r_{gas}{}^3]P/RT[MW_n/D]]^{1/3}$$

vereinfacht.

[0197] Als weiteres Mittel zur Herstellung von Mikrokügelchen einer gewünschten Größe zur Verwendung als stabilisierter Schaum als topische oder subkutane Zufuhrmittel kann man bei Kenntnis des Volumens und insbesondere des Radius der stabilisierende Verbindung/Vorläufer-Flüssigkeitströpfchen Filter mit geeigneter Größe verwenden, um die Größe der Tröpfchen der gasförmigen Vorstufe auf die geeigneten Kugeldurchmesser festzulegen.

[0198] Man könnte leicht eine Emulsion einer bestimmten Größe unter Verwendung einer geeigneten Filtergröße erreichen. Darüber hinaus würde, wie anhand der zur Bildung der Tröpfchen der gasförmigen Vorstufe einer definierten Größe erforderlichen Filtergröße ersichtlich ist, die Größe dieses Filters auch ausreichen, um irgendwelche möglichen bakteriellen Verunreinigungen zu entfernen und kann somit gleichermaßen als Sterilisationsfiltration verwendet werden.

[0199] Dieses Verfahren zur Herstellung der mit Gas gefüllten Mikrokügelchen, welche als topische oder subkutane Zufuhrmittel in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, kann auf alle gasförmigen Vorstufen angewendet werden, welche durch Temperatur aktiviert werden. Tatsächlich erlaubt die Senkung des

Gefrierpunkts des Lösungsmittelsystems die Verwendung von gasförmigen Vorstufen, welche Flüssig/Gas-Phasenübergänge bei Temperaturen von weniger als 0°C eingehen. Das Lösungsmittelsystem kann so ausgewählt werden, dass es ein Medium für die Suspendierung der gasförmigen Vorstufe darstellt. So weist beispielsweise eine Mischung von 20%-igem Propylenglycol mit gepufferter Salzlösung eine Gefrierpunktserniedrigung auf, die weit unterhalb des Gefrierpunkts von Wasser alleine liegt. Durch Erhöhung der Menge an Propylenglycol oder Zusatz von Materialien wie z. B. Natriumchlorid kann der Gefrierpunkt sogar noch weiter erniedrigt werden.

[0200] Die Auswahl geeigneter Lösungsmittelsysteme kann gleichermaßen mittels physikalischer Verfahren bestimmt werden. Wenn Substanzen wie Feststoffe oder Flüssigkeiten, welche hier als gelöste Stoffe bezeichnet werden, in einem Lösungsmittel wie z. B. auf Wasser basierenden Puffern gelöst werden, wird der Gefrierpunkt in einem Ausmaß gesenkt, welches von der Zusammensetzung der Lösung abhängt. So kann man, wie von Wall definiert wurde, die Gefrierpunktsemiedrigung des Lösungsmittels anhand der nachfolgenden Gleichung ausdrücken:

$$Lnx_a = Ln(1 - x_b) = \Delta H_{fus}/R(1/T_0 - 1/T)$$

wobei gilt:
x_a = Molenbruch des Lösungsmittels
x_b = Molenbruch des gelösten Stoffs
ΔH_{fus} = Schmelzenergie des Lösungsmittels
T_0 = Normaler Gefrierpunkt des Lösungsmittels

[0201] Der normale Gefrierpunkt des Lösungsmittels resultiert aus einer Lösung der Gleichung. Falls x_b gegenüber x_a klein ist, kann die obige Gleichung wie folgt umgeschrieben werden:

$$x^b = \Delta H_{fus}/R[T - T_0/T_0T] \approx \Delta H_{fus}\Delta T/RT_0^2$$

[0202] In der obigen Gleichung wird angenommen, dass die Temperaturänderung ΔT im Vergleich zu T_0 gering ist. Die obige Gleichung kann weiter vereinfacht werden, wenn angenommen wird, dass die Konzentration des gelösten Stoffes (in Molen pro 1000 Gramm Lösungsmittel) in Form der Molalität, d. h. m, ausgedrückt werden kann. Somit gilt:

$$x_b = m/[m + 1000/m_a] \approx mMa/1000$$

wobei gilt:
Ma = Molekulargewicht des Lösungsmittels und
m = Molalität des gelösten Stoffs in Molen pro 1000 Gramm.

[0203] Somit ergibt sich durch Ersetzen des Molenbruchs x_b:

$$\Delta T = [MaRTo2/1000\Delta H_{fus}]m$$

oder

$$\Delta T = K_f m, \text{ wobei gilt:} K_f = M_a RT_0^2/1000\Delta H_{fus}$$

[0204] K_f wird als molaler Gefrierpunkt bezeichnet und beträgt 1,86 Grad pro Einheit der molalen Konzentration in Wasser bei einem Druck von einer Atmosphäre. Die obige Gleichung kann dazu verwendet werden, den molalen Gefrierpunkt von Lösungen von mit gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, genau zu bestimmen.

[0205] Somit kann die oben genannte Gleichung verwendet werden, um die Gefrierpunktserniedrigungen abzuschätzen und die geeigneten Konzentrationen von gelösten, flüssigen oder festen Stoffen zu bestimmen, welche notwendig sind, um die Gefriertemperatur des Lösungsmittels auf einen geeigneten Wert abzusenken.

[0206] Verfahren zur Herstellung der temperaturaktivierten, mit Gas oder mit gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen umfassen: (a) Verwirbelung einer wässrigen Suspension von mit gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden; Abwandlung dieses Verfahrens umfassen eine optionale Autoklavenbehandlung vor dem Schütteln, optionales Erhitzen einer wässrigen Suspension, einer gasförmigen Vorstufe und eines Lipids, optionales Ventilieren des die Suspension enthaltenen Gefäßes, optionales Schütteln oder den Mikrokügelchen mit der gasförmigen Vorstufe erlauben, sich spontan zu bilden und Abkühlen der mit gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchensuspension, sowie optionales extrudieren einer wässrigen Suspension einer gasförmigen Vorstufe und eines Lipids durch einen Filter von etwa 0,22 µ; alternativ kann das Filtrieren während der in vivo-Verabreichung der resultierenden Mikrokügel-

chen erfolgen, wobei ein Filter von etwa 0,22 µ eingesetzt wird;

(b) Ein Mikroemulgierungsverfahren, bei welchem eine wässrige Suspension von mit Gas und mit gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung mittels Schüttelns bzw. Bewegens emulgiert wird und vor der Verabreichung an einen Patienten zur Bildung der Mikrokügelchen erhitzt wird; und

(c) Bildung einer gasförmigen Vorstufe in einer Lipid-Suspension mittels Erhitzens und/oder Schüttelns bzw. Bewegens, wobei die weniger dichten, mit Gas und gasfönniger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen aufgrund der Expansion und Verdrängung anderer Mikrokügelchen im Gefäß und Ventilieren des Gefäßes zur Freisetzung der Luft auf der Oberfläche der Lösung schwimmen; und

(d) bei jedem der oben genannten Verfahren die Verwendung eines verschlossenen Gefäßes, welches die wässrige Suspension der gasförmigen Vorstufe und der stabilisierenden Verbindung, wie z. B. eines biokompatiblen Lipids enthält, wobei die Suspension bei einer Temperatur unterhalb der Phasenübergangstemperatur der gasförmigen Vorstufe gehalten wird, gefolgt von einer Autoklavenbehandlung, um die Temperatur auf einen Wert oberhalb der Phasenübergangstemperatur zu erhöhen, gegebenenfalls unter Schütteln, oder indem ermöglicht wird, dass sich die Mikrokügelchen mit der gasförmigen Vorstufe spontan bilden, wobei die expandierte gasförmige Vorstufe im verschlossenen Gefäß den Druck in diesem Gefäß erhöht, sowie die Abkühlung der Suspension mit dem mit Gas gefüllten Mikrokügelchen, wonach ebenfalls ein Schütteln stattfinden kann.

[0207] Eine Gefriertrocknung ist nützlich, um Wasser und organische Materialien von den stabilisierenden Verbindungen zu entfernen, bevor unter Schütteln Gas eingebracht wird ("shaking gas instillation method). Es können Trocknungs/Gaseinbringungsverfahren zur Entfernung von Wasser aus den Mikrokügelchen verwendet werden. Durch vorheriges Einschließen der gasförmigen Vorstufe in den getrockneten Mikrokügelchen nach dem Erwärmen (d. h. vor dem Trocknen) kann die gasförmige Vorstufe expandieren, um die Mikrokügelchen zu füllen. Es kann auch eine gasförmige Vorstufe verwendet werden, um getrocknete Mikrokügelchen zu füllen, nachdem diese einem Vakuum ausgesetzt worden sind. Da die getrockneten Mikrokügelchen bei einer Temperatur unterhalb ihres Gelzustands/Flüssigkristalltemperatur aufbewahrt werden, kann die Trocknungskammer langsam mit der gasförmigen Vorstufe in ihrem Gaszustand befällt werden, z. B. kann Perfluorbutan verwendet werden, um die getrockneten Mikrokügelchen, welche aus Dipalmitoylphophatidylcholine (DPPC) bestehen, bei Temperaturen zwischen 4°C (dem Siedepunkt des Perlfluorbutans) und unterhalb von 40°C, der Phasenübergangstemperatur des biokompatiblen Lipids zu befüllen. In diesem Fall wäre es besonders bevorzugt, die Mikrokügelchen bei Temperaturen von etwa 4°C bis etwa 5°C zu befüllen.

[0208] Bevorzugte Verfahren zur Herstellung der temperaturaktivierten, mit gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen umfassen das Schütteln einer wässrigen Lösung, welche eine stabilisierende Verbindung, wie z. B. ein biokompatibles Lipid enthält, in Anwesenheit einer gasförmigen Vorstufe bei einer Temperatur unterhalb der Gelzustands-/Flüssigkristallzustandsphasenübergangstemperatur des Lipids sowie unterhalb der Flüssigkeits-/Gasphasenübergangstemperatur der gasförmigen Vorstufe. Das Erhitzen des Gemischs auf eine Temperatur oberhalb der Flüssigkeits/Gaszustandsphasenübergangstemperatur der gasförmigen Vorstufe bewirkt dann, dass die Vorstufe expandiert. Anschließend wird das Erhitzen unterbrochen und die Temperatur des Gemischs wird unter die Flüssigkeits-/Gaszustandsphasenübergangstemperatur sinken gelassen. Ein Schütteln des Gemischs kann während des Erhitzungsschrittes oder nachdem das Gemisch abkühlen gelassen wurde, stattfinden.

[0209] In der vorliegenden Erfindung wird auch die Verwendung eines Verfahrens zur Herstellung von mit gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen in Erwägung gezogen, umfassend das Schütteln einer wässrigen Lösung, welche eine stabilisierende Verbindung, wie z. B. ein biokompatibles Lipid in Anwesenheit einer gasförmigen Vorstufe umfasst, sowie die Abtrennung der resultierenden mit Gas oder einer gasförmigen Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen zur topischen oder subkutanen Zufuhr von Wirkstoffen. Die nach den vorstehenden Verfahren hergestellten Mikrokügelchen werden hier als mit einer gasförmigen Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen bezeichnet, welche durch ein Verfahren des Schüttelns in Gelzustand und der Einbringung einer gasförmigen Vorstufe hergestellt werden.

[0210] Herkömmliche, mit Wasser gefüllte Liposomen des Standes der Technik werden routinemäßig bei einer Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide, welche zur ihrer Herstellung verwendet werden, gebildet, da diese flexibler sind und somit in biologischen Systemen im flüssig-kristallinen Zustand nützlich sind. Siehe beispielsweise Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. 1978, 75, 4194–4198. Dem gegenüber sind die Mikrokügelchen, welche gemäß der hier beschriebenen bevorzugten Ausführungsformen hergestellt werden, mit gasförmiger Vorstufe gefüllt, was eine höhere Flexibilität verleiht, da die gasförmigen Vorstufen nach der Gasbildung komprimierbarer und nachgiebiger als eine wässrige Lösung sind. Somit können die mit gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen in biologischen Systemen verwendet werden, wenn sie bei einer Temperatur unterhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipids gebildet werden, obwohl die Gelphase rigider ist.

[0211] Die in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogenen Verfahren beinhalten das Bewegen bzw. Schütteln einer wässrigen Lösung, welche eine stabilisierende Verbindung wie z. B. ein biokompatibles Lipid enthält, in Anwesenheit einer temperaturaktivierten gasförmigen Vorstufe. Das hier verwendete Schütteln wird als eine Bewegung definiert, welche eine wässrige Lösung so in Bewegung setzt, dass die gasförmige Vorstufe aus der lokalen Umgebung in die wässrige Lösung eingeführt wird. Zum Schütteln kann irgendeine Art von Bewegung eingesetzt werden, welche die wässrige Lösung in Bewegung setzt und zur Einführung der gasförmigen Vorstufe führt. Das Schütteln muss mit einer hinreichenden Krafteinwirkung erfolgen, um die Bildung eines Schaums nach einer gewissen Zeitdauer zu ermöglichen.

[0212] Das Schütteln geschieht vorzugsweise mit einer hinreichenden Krafteinwirkung, so dass der Schaum innerhalb eines kurzen Zeitraums, wie z. B. 30 Minuten gebildet wird, vorzugsweise innerhalb von 20 Minunten und weiter bevorzugt innerhalb von 10 Minuten. Das Schütteln kann mittels Mikroemulgierung, mittels Mikrofluidisierung, beispielsweise mittels Strudelbildung, wie z. B. Verwirbelung, Hin-und-her-Bewegungen oder Auf-und-ab-Bewegung erfolgen. Für den Fall, dass die Zugabe der gasförmigen Vorstufe im flüssigem Zustand erfolgt, kann zusätzlich zu den oben aufgeführten Schüttelverfahren auch eine Beschallung verwendet werden. Darüber hinaus können verschiedene Bewegungstypen kombiniert werden. Weiterhin kann das Schütteln erfolgen, indem der Behälter, welcher die wässrige Lipidlösung enthält, geschüttelt wird, oder in dem die wässrige Lösung innerhalb des Containers geschüttelt wird, ohne dass der Container selbst geschüttelt wird. Darüber hinaus kann das Schütteln manuell oder mittels einer Maschine erfolgen. Mechanische Schüttelvorrichtungen, welche verwendet werden können, umfassen beispielsweise einen Schütteltisch, wie z. B. einen VWR Scientific (Cerritos CA) Schütteltisch, eine Mikrofluidisierungsvorrichtung, eine Wig-L-Bug™-Vorrichtung (Crescent Dental Manufcturing, Inc., Lyons, IL), welche, wie sich herausgestellt hatte, besonders gute Resultate ergibt, einen mechanischen Farbmischer sowie andere bekannte Vorrichtungen. Andere Mittel zum Schütteln umfassen die Wirkung der gasförmigen Vorstufe, welche unter einer hohen Geschwindigkeit oder einem hohen Druck emittiert wird. Es ist auch einzusehen, dass bei einem größeren Volumen an wässriger Lösung vorzugsweise die gesamte Kraftmenge entsprechend erhöht wird. Heftiges Schütteln wird als mindestens etwa 60 Schüttelbewegung pro Minute definiert und wird bevorzugt. Eine Verwirbelung bei mindestens 1000 Umdrehungen pro Minute wird als ein Beispiel von heftigem Schütteln weiter bevorzugt. Eine Verwirbelung bei 1800 Umdrehungen pro Minute wird am meisten bevorzugt.

[0213] Die Bildung von mit gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen beim Schütteln kann anhand der Anwesenheit eines Schaums auf der Oberfläche der wässrigen Lösung detektiert werden. Dies geht mit einer Verringerung des Volumens der wässrigen Lösung bei der Schaumbildung einer. Vorzugsweise ist das Endvolumen des Schaums mindestens das zweifache des anfänglichen Volumens der wässrigen Lipidlösung; weiter bevorzugt ist das Endvolumen des Schaums mindestens etwa das dreifache des anfänglichen Volumens der wässrigen Lösung; sogar noch weiter bevorzugt ist das Endvolumen des Schaums mindestens etwa das vierfache des anfänglichen Volumens der wässrigen Lösung; und am meisten bevorzugt wird die gesamte wässrige Lipidlösung in Schaum umgewandelt.

[0214] Die benötigte Zeitdauer des Schüttelns kann anhand der Schaumbildung dedektiert werden. So können beispielsweise 10 ml einer Lipidlösung in einem 50 ml Zentrifugenglas annährend 15 bis 20 Minuten lang verwirbelt werden oder so lange, bis die Viskosität der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen hinreichend hoch wird, so dass sie nicht länger an den Seitenwänden haften, während gewirbelt wird. Zu diesem Zeitpunkt kann der Schaum bewirken, dass die Lösung, welche die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen enthält, auf ein Niveau von 30 bis 35 ml ansteigt.

[0215] Die Konzentration an stabilisierender Verbindung, insbesondere des Lipids, welche zur Bildung einer bevorzugten Schaummenge benötigt wird, variiert in Abhängigkeit vom Typ der stabilisierenden Verbindung wie zum Beispiel dem verwendeten biokombatiblen Lipid und kann leicht von einem Fachmann nach Kenntnis der vorliegenden Offenbarung ermittelt werden. So beträgt beispielsweise in bevorzugten Ausführungsformen die Konzentration an 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), welches zur Bildung der mit Gas oder mit gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen gemäß den in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogenen Verfahren verwendet wird, etwa 0,1 mg/ml bis etwa 30 mg/ml an Salzlösung. Die Konzentration an Distearoylphosphatidylcholin (DSPC), welche in bevorzugten Ausführungsform verwendet wird, beträgt etwa 0,1 mg/ml bis etwa 10 mg/ml an Salzlösung.

[0216] Genauer gesagt gibt DPPC in einer Konzentration von 20 mg/ml bis 30 mg/ml beim Schütteln ein Gesamtvolumen an Suspension und eingeschlossener gasförmiger Vorstufe, welches viermal größer ist als das Volumen der Suspension alleine. DSPC gibt in einer Konzentration von 10 mg/ml beim Schütteln ein Gesamtvolumen, welches vollständig frei von irgendeiner flüssigen Suspension ist und in seiner Gesamtheit nur Schaum enthält.

[0217] Der Fachmann wird einsehen, sobald er durch die vorliegende Offenbarung instruiert ist, dass die Lipide sowie die weiteren stabilisierenden Verbindungen, welche als Ausgangsmaterialien verwendet werden, oder die Mikrokügelchen als Endprodukte manipuliert werden können, bevor oder nachdem sie den in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogenen Verfahren unterzogen werden bzw. worden sind. So kann bei-

spielsweise die stabilisierende Verbindung, wie zum Beispiel ein biokombatibles Lipid, hydratisiert und anschließend lyophilisiert werden, in Gefrier- und Auftauzyklen verarbeitet werden oder einfach nur hydratisiert werden. In bevorzugten Ausführungsformen wird das Lipid vor der Bildung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen hydratisiert und anschließend lyophilisiert, oder hydratisiert und anschließend in Gefrier- und Auftauzyklen verarbeitet und dann lyophilisiert. Gemäß den in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogenen Verfahren kann die Anwesenheit eines Gases, welches zum Beispiel Luft sein kann, jedoch nicht darauf beschränkt ist, auch durch die lokale umgebende Atmosphere ermöglicht werden. Die lokale umgebende Atmosphere kann die Atmosphere innerhalb eines verschlossenen Behälters sein, oder im Falle eines unverschlossenen Behälters die äußere Umgebung. Alternativ kann beispielsweise ein Gas in den Behälter, welcher die wässrige Lipidlösung enthält, oder in die wässrige Lipidlösung selbst injiziert oder auf andere Art und Weise zugegeben werden, um ein von Luft verschiedenes Gas zur Verfügung zu stellen. Gase, welche nicht schwerer als Luft sind, können zu einem verschlossenen Behälter zugegeben werden, während Gase, die schwerer Luft sind, sowohl zu einem verschossenen als auch zuo einem unverschlossenen Behälter zugegeben werden können. Dementsprechend umfasst die vorliegende Erfindung den gleichzeitigen Einschluss von Luft und/oder anderen Gasen zusammen mit gasförmigen Vorstufen.

[0218] Wie weiter oben im Abschnitt, der von der stabilisierenden Verbindung handelt, bereits beschrieben wurde, werden die in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogenen bevorzugten Verfahren bei einer Temperatur unterhalb der Gel/Kristallzustands-Phasenübergangstemperatur des eingesetzten Lipids durchgeführt. Unter "Gel-/Flüssigkristallzustands-Phasenübergangstemperatur" wird eine Temperatur verstanden, bei welcher sich die Lipiddoppelschicht von einem Gelzustand in einen Flüssigkristallzustand umwandelt. Siehe z. B. Chapman et al., J. Biol. Chem. 1974, 249, 2512–2521.

[0219] Somit können die oben beschriebenen Vorstufen der stabilisierten Mikrokügelchen auf die selbe Art und Weise eingesetzt werden wie die anderen stabilisierten Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sobald sie mittels Verabreichung zu dem Gewebe eines Patienten aktiviert worden sind, in welchem Faktoren wie zum Beispiel die Temperatur oder der PH-Wert die Bildung des Gases bewirkt. Es wird bevorzugt, dass es sich bei dieser Ausführungsform um eine Ausführungsform handelt, bei welcher die gasförmigen Vorstufen eine Phasenübergang von flüssigen zu gasförmigen Zuständen in der Nähe der normalen Körpertemperatur des besagten Patienten durchmachen, und dadurch durch die Temperatur der besagten Patientengewebe aktiviert werden, so dass sie dann den Übergang in die Gasphase eingehen. Weiter bevorzugt ist dieses Verfahren ein Verfahren, bei welchem das Patientengewebe menschliches Gewebe ist, welches eine normale Temperatur von etwa 37°C aufweist, wobei die gasförmigen Vorstufen Phasenübergänge von flüssigen in gasförmige Zustände in der Nähe von 37°C eingehen.

[0220] Alle die oben genannten Ausführungsformen involvierenden Präparate der stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können mittels Autoklavenbehandlung oder Sterilfiltration sterilisiert werden, falls diese Verfahren entweder vor dem Gaseinbringungsschritt oder vor der durch Temperatur vermittelten Umwandlung der temperaturempfindlichen gasförmigen Vorstufen in der Suspension in Gas durchgeführt werden. Alternativ können ein oder mehrere baktezide Mittel und/oder Konservierungsstoffe in der Formulierung des stabilisieren Schaums enthalten sein, wie Beispiel Natriumbenzoat, alle quartären Ammoniumsalze, Natriumazid, Methylparaben, Propylparaben, Sorbinsäure, Ascorbylpalmitat, butyliertes Hydroxyanisol, butyliertes Hydroxytoluol, Chlorbutanol, Dehydroessigsäure, Ethylendiamin, Monothioglycerin, Kaliumbenzoat, Kaliummetabisuffit, Kaliumsorbat, Natriumbisulfit, Schwefeldioxyd und organische Quecksilbersalze. Eine derartige Sterilisierung, welche auch mit anderen herkömmlichen Mitteln wie zum Beispiel Bestrahlung erreicht werden kann, wird notwendig sein, wenn der stabilisierte Schaum aus Mikrokügelchen zur topischen Verabreichung unter Umständen verwendet wird, welche als invasif bezeichnet werden können. Die geeigneten Mittel zur Sterilisierung erschließen sich dem Fachmann, der durch die vorliegende Beschreibung der stabilisierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen und ihrer Verwendung instruiert worden ist. Der stabilisierte Schaum wird allgemein in Form einer wässrigen Suspension gelagert, aber im Falle von getrockneten Mikrokügelchen oder von getrockneten Lipidkügelchen kann der stabilisierte Schaum als ein getrocknetes Pulver gelagert werden, welches zur Wiederherstellung vor seiner Verwendung bereit ist.

[0221] Die stabilisierten Schäume, welche die erfindungsgemäßen Mikrokügelchen umfassen, sollten aus einem Material hergestellt werden, welches so undurchdringlich wie möglich ist, so lange die anderen hier ausgeführten Erfordernisse erfüllt sind. Bei einem undurchdringlichen Material handelt es sich um ein Material, welches den Durchtritt einer substantiellen Menge des Inhalts der Mikrokügelchen unter typischen Lagerbedingungen oder bei ihrer Verwendung vor dem Eintreten der induzierten Freisetzung, welche gewöhnlich durch Druck oder Reibung aufgrund der Tätigkeit eines Patienten beim Einreiben des Schaums in seine bzw. ihre Haut erfolgt, nicht erlaubt. Der hier im Zusammenhang mit der Undurchdringlichkeit verwendete Begriff substantiell wird als mehr als etwa 50% der Inhaltsstoffe definiert, wobei sowohl Gas als auch Wirkstoff Inhaltsstoffe sind. Vorzugsweise werden nicht mehr als 25%, weiter bevorzugt nicht mehr als etwa 10% und am meisten bevorzugt nicht mehr als etwa 1% des Gases und des Wirkstoffes freigesetzt. Die Lagertemperatur liegt

vorzugsweise unterhalb der Phasenübergangstemperatur des Materials, welches die Mikrokügelchen bildet.

[0222] Die Stabilität der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung ist von signifikanter praktischer Bedeutung; sie tendieren dazu, eine größere Stabilität während der Lagerung aufzuweisen als andere mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen, welche mit bekannten Verfahren hergestellt worden sind, wie zum Beispiel einer Druckbeaufschlagung oder anderen Verfahren. So sind beispielsweise 72 Stunden nach ihrer Bildung herkömmlich hergestellt, Gas enthaltende Mikrokügelchen oft völlig frei von Gas, wobei das Gas aus den Mikrokügelchen herausdiffundiert ist und/oder Mikrokügelchen aufgebrochen sind und/oder miteinander verschmolzen sind. Im Vergleich damit weisen wirkstoffhaltige, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte polare Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung allgemein eine Lagerstabilität von mehr als etwa 3 Wochen auf, oftmals von mehr als 3 Monaten oder sehr viel länger, zum Beispiel mehr als 12 Monate oder sogar 2 Jahre.

[0223] Die erfindungsgemäßen stabilisierten Schäume, welche aus Materialien in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Verfahren hergestellt werden, weisen eine cremige Konsistenz auf, welche ideal zur Bedeckung eines ausgewählten Gewebes ist. Der stabilisierte Schaum fühlt sich glatt und samtartig an. Darüber hinaus weisen die erfindungsgemäßen stabilisierten Schäume ungewöhnliche Eigenschaften auf, welche es ihnen ermöglicht, als Potenzierungsvehikel die Verabreichung von Wirkstoffen, wie zum Beispiel therapeutischen Mitteln und Kosmetika, zu einem ausgewählten Gewebe zu erleichtem und die Absorption solcher aktivenr Wirkstoffe durch das ausgewählte Gewebe zu fördern.

[0224] Die vorliegende Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen weiter erläutert, welche Herstellung und Tests der stabilisierten Schäume, welche mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen umfassen, illustrieren. Von den nachfolgenden Beispielen, wobei es sich bei den Beispielen 1–26 und 32 um Referenzbeispiele handelt, wurden die Beispiel 1–6, 11, 13, 14, 17, 18, 26–30, 32 und 33 tatsächlich durchgeführt. Die restlichen Beispiele sind hypothetisch. Diese Beispiele sollen den Umfang der vorliegenden Erfindung in keiner Weise limitieren.

Beispiele bevorzugter Ausführungsformen

Beispiel 1

Herstellung von mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen.

[0225] 50 mg 1,2-Dipaimitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (MW: 734,05, Pulver, – Chargenbezeichnung 160pc-183) (Avanti-Polar Lipids, Alabaster, Ala.) wird gewogen und mit 5,0 ml Salzlösung (0,9% NaCl) oder phosphatgepufferter Salzlösung (0,8% Natriumchlorid, 0,02% Kaliumchlorid, 0,115% dibasisches Natriumphosphat und 0,2% monobasisches Kaliumphosphat, pN-Wert eingestellt auf 7,4) in einem Zentrifugenglas hydratisiert. Die hydratisierte Suspension wird anschließend auf einer Verwirbelungsmaschine (Scientific Industries, Bohemia, N1n 10 Minuten lang bei einer Instrumenteneinstellung von 6,5 geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt sollte ein Volumen von 12 ml beobachtet werden. Die Salzlösung sollte von 5,0 auf etwa 4 ml abnehmen.

[0226] Die Größe der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche mit dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt werden, kann anschließend mittels optischer Mikroskopie bestimmt werden. Es sollte bestimmt werden, dass die größte Größe der Mikrokügelchen im Bereich von etwa 50 bis etwa 60 µm liegt und die kleinste detektierte Größe sollte etwa 8 µm betragen. Die mittlere Größe sollte im Bereich von etwa 15 bis 20 µm liegen.

[0227] Die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen werden anschließend durch eine "NUCLEPORE"-Membran von 8, 10 oder 12 µm unter Verwendung eines Swin-Lok Filterhalters (Nuclepore Filtration Products, Costar Corp., Cambridge, MA) und einer 20 cc Spritze (Becton Dickinson & Co., Rutherford, NJ) filtriert. Die Membran ist eine 10 oder 12 µm "NUCLEPORE"-Membran (Nuclepore Filtration Products, Costar Corp., Cambridge, MA). Der 10,0 µm Filter wird in den Swin-Lok-Filterhalter eingesetzt und die Kappe wird sicher festgeschraubt. Die lipidbasierende Mikrokügelchenlösung wird aufgeschüttelt und über eine 18 gauge-Nadel in die 20 cc Spritze überführt. Es werden etwa 12 ml der mit Gas gefüllten Schaumlösung in der Spritze vorgelegt und die Spritze wird auf den Swin-Lok-Filterhalter geschraubt. Die Spritze und der Filterhalter-Aufbau werden herumgedreht, so dass die größeren Menge der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen bis zum Kopfende aufsteigen können. Anschließend wird die Spritze vorsichtig hochgedrückt und die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen werden auf diese Art und Weise filtriert.

[0228] Überlebensrate der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen (d. h. die Menge der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche im Anschluss an den Extrusionsprozess noch existieren), beträgt nach einer Extrusion durch das 10,0 µm Filter etwa 83–92%. Vor der manuellen Extrusion beträgt das Volumen des Schaums etwa 12 ml und das Volumen der wässrigen Lösung etwa 4 ml. Im Anschluss an die manuelle Extrusion beträgt das Volumen des Schaums etwa 10–11 ml und das Volumen der

wässrigen Lösung etwa 4 ml.

[0229] Anschließend wird das optische Mikroskop wieder verwendet, um die Größenverteilung der extrudierten, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen zu bestimmen. Es wird bestimmt, dass die größte Größe der Mikrokügelchen im Bereich von etwa 25 bis etwa 30 μm und die Größe der kleinsten detektierten Mikrokügelchen etwa 5 μm beträgt. Die durchschnittliche Größe liegt im Bereich von etwa 8 bis etwa 15 μm.

[0230] Es wird gefunden, dass im Anschluss an die Filtration mehr als 90% der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen kleiner als 15 μm sind.

Beispiel 2

Herstellung von mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllte Mikrokügelchen unter Einschluss einer Lyophilisierung

[0231] Fünfzig mg 1,2-Dipalmityol-sn-glycero-3-phosphocholin (MW: 734,05, Pulver) (Avanti-Polar Lipids, Albaster, Ala.) wird gewogen und in ein Zentrifugenglas eingefüllt. Das Lipid wird anschließend mit 5,0 ml Salzlösung (0,9% NaCl) hydratisiert. Die Lipidlösung wird danach 10 Minuten lang bei einer Instrumenteneinstellung von 6,5 verwirbelt. Im Anschluss an die Verwirbelung wird die gesamte Lösung mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wird die Probe in die Lyophilisierungsvorrichtung zum Gefriertrocknen eingefüllt; die Probe wird in der Lyophilisierungsvorrichtung 18 Stunden lang belassen. Das getrocknete Lipid wird aus der Lyophilisierungsvorrichtung entnommen und in 5 ml Salzlösung rehydratisiert und 10 Minuten lang bei einer Instrumenteneinstellung von 6,5 verwirbelt. Eine kleine Probe dieser Lösung wird auf einen Objektträger pipettiert und die Lösung wird unter einem Mikroskop betrachtet. Die Größe der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen wird danach bestimmt. Es wird bestimmt, dass die größte Größe der Mikrokügelchen etwa 60 μm und die kleinste detektierte Größe etwa 20 μm beträgt. Die durchschnittliche Größe liegt im Bereich von etwa 30 bis 40 μm.

Beispiel 3

Beipiel der Unmöglichkeit, mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllte Mikrokügelchen-Präparate oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipids herzustellen

[0232] Fünfzig mg 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (MW: 734,05, Pulver) (Avanti-Polar Lipids, Albaster, Ala.) wird gewogen und in ein Zentrifugenglas eingefüllt. Ein annähernd 2 Fuß langer Latexschlauch (Innendurchmesser 0,25 inch) wird um ein konisches Zentrifugenglas in einer spulenartigen Anordnung gewickelt. Der Latexschlauch wird anschließend mit einem Elektroisulationsband an dem Zentrifugenglas befestigt. Daraufhin wird der Latexschlauch mit einem Umlaufbad einer konstanten Temperatur verbunden (VWR Scientific Model 1131). Die Temperatur des Bades wird auf 60°C eingestellt, und der Wasserumlauf wird auf eine hohe Geschwindigkeit der Zirkulation durch den Schlauch eingestellt. In die Lipidlösung wird ein Thermometer hineingestellt; es wird gefunden, dass der Messwert zwischen 42°C und 50°C beträgt.

[0233] Die Lipidsuspension wird über einen Zeitraum von 10 Minuten bei einer Instrumenteneinstellung der Verwirbelungsvorrichtung von 6,5 verwirbelt. Es wird bemerkt, dass eine sehr geringe Schaumbildung des Lipids (Phasenübergangstemperatur = 41°C) erfolgt und dass keine merklichen Mengen an mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen gebildet werden. Ein optisches Mikroskop zeigt große Lipidteilchen in der Lösung an. Die Anzahl der mit Gas oder gasförmigen Vorstufen gefüllten Mikrokügelchen, die sich bei dieser Temperatur bilden, beträgt weniger als 3% der Anzahl, welche sich bei einer Temperatur unterhalb der Phasenübergangstemperatur bilden. Die Suspension wird 15 Minuten lang stehen gelassen, bis sich die Suspension auf Raumtemperatur (25°C) äquilibriert hat. Die Suspension wird anschließend 10 Minuten lang verwirbelt. Nach 10 Minuten wird bemerkt, dass sich mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen bilden.

[0234] Der obige Versuch demonstriert die Notwendigkeit, die Verwirbelung mit dem Lipid im Gelzustand durchzuführen, um stabile Schäume zu bilden.

Beispiel 4

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllter Mikrokügelchen unter Verwendung eines Gefrier/Auftau-Verfahrens

[0235] Fünfzig mg 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (MW: 734,05, Pulver) (Avanti-Polar Lipids, Albaster, Ala.) wird in ein Zentrifugenglas eingefüllt. Das Lipid wird anschließend hydratisiert, indem 5,0 mi

0,9%-iges NaCl zugegeben wird. Die wässrige Lipidsuspension wird 10 Minuten lang bei einer Instrumenteneinstellung von 6,5 verwirbelt. Nach dem Verwirbeln wird die gesamte Suspension anschließend in einem Wasserbad auf eine Temperatur von etwa 45°C erhitzt und anschießend eingefroren. Das Verfahren des Erhitzens und Einfrierens (Gefrier/Auftau-Verfahren) wird anschießend 8 mal wiederholt. Die hydratisierte Suspension wird anschließend 10 Minuten lang bei einer Instrumenteneinstellung von 6,5 verwirbelt. Die mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen werden anschließend detektiert, wie in Beispiel 1 beschrieben wurde.

Beispiel 5

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen unter Verwendung eines Lösungsmittelgemischs eines wässrigen Puffers und Propylenglycol

[0236] Zehn mg 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (MW: 734,05, Pulver) (Avanti-Polar Lipids, Albaster, Ala.) wird in ein Zentrifugenglas eingefüllt. Das Lipid wird anschließend mit einem Gemisch aus 0,9%-igem NaCl und Propylenglycol (9 : 1 oder 7 : 1, v : v) (Specrum Chemical Mfg. Corp., Gardena, Calif.) hydratisiert. Die wässrige Lipidsuspension wird 10 Minuten lang bei einer Instrumenteneinstellung von 6,5 verwirbelt. Die Größen der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche sich bilden, werden anschließend mit einem optischen Größenbestimmungsgerät vom Typ Accusizer Model 770 (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, Calif.) bestimmt, wobei die Mediangröße ≤ 10 μm beträgt.
[0237] Versuche unter Verwendung anderer Propylenglycol-Suspensionen zur Herstellung der mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen werden zeigen, dass der Schaum einen geringeren mittleren Durchmesser aufweist und stabiler zu sein scheint, als dann, wenn kein Polypropylenglycol verwendet wird. Die Schaumhöhe (Schaumvolumen) pro mg des Lipids ist unter Verwendung von Propylenglycol größer als ohne Propylenglycol. Ein zusätzlicher Vorteil der Verwendung von Propylenglycol besteht darin, dass er die die Durchdringung eines ausgewählten Gewebes verbessernden Eigenschaften des auf Lipid basierenden Schaums für Kosmetika und dennale Medikamentenzufuhrzwecke verbessern kann.

Beispiel 6

Herstellung von Vitamin E verkapselt in mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen

[0238] Es wird das selbe Präparat in wie Beispiel 1 hergestellt mit der Abwandlung, dass vor dem Verwirbeln 100 mg Vitamin E-Acetat U.S.P./N.F. (212 μmol, Spectrum Chemical Mfg. Corp., Gardena, Calif.) zugegeben werden und anschießend heftig verwirbelt wird. Dies ergibt eine identische Menge an Schaum, welcher indessen Vitamin E enthält.

Beispiel 7

Herstellung von Vitamin D_2 oder D_3, verkapselt in mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen

[0239] Es wird das selbe Präparat in wie Beispiel 1 hergestellt mit der Abwandlung, dass vor dem Verwirbeln 100 mg Vitamin D_2 (Ergocalciferol) U.S.P./N.F. (252 μmol, Spectrum Chemical Mfg. Corp., Gardena, Calif.) oder 100 mg D_3 (Cholecalciferol) U.S.P./N.F. (216 μmol, Spectrum Chemical Mfg. Corp., Gardena, Calif.) zugegeben werden, gefolgt von einer heftigen Vewirbelung. Dies ergibt ein identisches Volumen an Schaum, welcher indessen jetzt Vitamin D_2 bzw. D_3 enthält.

Beispiel 8

Herstellung von Vitamin A, verkapselt in mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen

[0240] Es wird das selbe Präparat wie in Beispiel 1 hergestellt mit der Abwendlung, dass vor der Verwirbelung 100 mg Vitamin A (Retinylacetat) U.S.P./N.F. (304 μmol, Spectrum Chemical Mfg. Corp., Gardena, Calif.) zugegeben werden, gefolgt von einer heftigen Verwirbelung. Dies ergibt ein identisches Volumen an Schaum, welche indessen jetzt Vitamin A enthält.
[0241] Beispiel 9

Herstellung von einer Creme aus mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen zur topischen Zufuhr

[0242] Es werden mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen gemäß den in der gleichzeitig anhängigen Anmeldung mit der US-Seriennummer 717,084 und US-Seriennummer 717,899 hergestellt, welche beide am 18. Juni 1991 hinterlegt wurden.

[0243] Zur einer kleinen Mischkugel werden 60 ml mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen sowie 10 ml Glyzerin zugegeben. Die Mischung wird anschließend zusammen mit 2 g Lanolin vorsichtig zusammengefaltet. Die Mischung wird zur Seite gestellt. In einem getrennten Behälter werden anschießend 2 g Cetylalkohol und 1 g Cholesterinbasis vorgelegt. Hierzu werden 2 g Natriumcarbomer 941 zugegeben, und diese Mischung wird einmal mehr zusammengefaltet. Zu dieser Mischung werden anschließend 50 mg Methylparaben, 50 mg Propylparaben und 50 mg Quaternium 15, welches zuvor in 1 ml Ethanol gelöst wurde, zugegeben. Die zweite Mischung wird anschließend bis zur Gleichmäßigkeit venieben und die beiden Mischungen werden zusammengegeben und erneut zusammengefaltet. Zu dieser Mischung werden anschließend 120 Gramm hydrophile Salbengrundlage zugegeben und die Gesamtmenge wird unter Bildung einer sanften, cremigen weichen Masse zusammengefaltet.

Beispiel 10

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen in einem gemischten Vehikel

[0244] Zehn mg 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (Avanti-Polar Lipids, Albaster, Ala.) werden in ein Zentrifugenglas gegeben. Das Lipid wird anschließend mit einem Gemisch von 0,9%-igem wässrigem Natriumchlorid, Glycerin und Propylenglycol (8 : 1 : 1, v : v : v) (Spectrum Chemical Mfg. Corp., Gardena, Calif.) hydratisiert. Die Suspension wird 10 Minuten lang bei einer Instrumenteneinstellung von 6,5 verwirbelt. Die resultierenden, mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Lipiddoppelschichten werden anschließend mit einer optischen Größenbestimmungsvorrichtung vom Typ Accusizer Model **770** (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, Calif.) in ihrer Größe bestimmt, wobei die Mediangröße etwa 10 μm beträgt. Das Gesamtvolumen von Schaum und Flüssigkeit wird auf etwa 35 ml ansteigen.

Beispiel 11

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche im Wesentlichen kein wässriges Restvolumen mehr aufweisen

[0245] Es wird das selbe Verfahren wie in Beispiel 10 befolgt, mit der Abwandlung, dass 25 $mg*ml^{-1}$ bis 50 $mg*ml^{-1}$ an Lipid verwendet werden. Beim Verwirbeln bilden sich annähernd 45 ml bis 50 ml an Schaumvolumen, und die Formulierung enthält im wesentlichen keine Restflüssigkeit mehr.

Beispiel 12

Herstellung von mit Gas oder gasförmige Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mit Cholesterinsulfat

[0246] Die in Beispiel 10 beschriebene Formulierung wird verwendet, mit der Abwandlung, das 1-5 mol% Cholesterinsulfat (Sigma, St. Louis, Mo.) zugegeben werden. Die Suspension wird anschließend verwirbelt, um einen Schaum zu ergeben, welcher dem in Beispiel 10 beschriebenen Schaum ähnelt.

Beispiel 13

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mit PEG-yliertem Lipid

[0247] Die Formulierung, welche gemäß Beispiel 10 hergestellt wurde, wird verwendet, mit der Abwandlung, dass 1-5 mol% 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[poly(ethylenglycol) 5000] (Reinheit 99%, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala.) in der Fonnulierung enthalten sind. Die Suspension wird anschließend wie in Beispiel 10 beschrieben verwirbelt, um einen Schaum zu ergeben, welcher dem in Beispiel 10 beschriebenen Schaum ähnelt.

Beispiel 14

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mit Phosphatidsäure

[0248] Die wie in Beispiel 10 beschrieben hergestellte Formulierung wird verwendet, mit der Abwandlung, dass 1-5 mol% Phosphatidsäure (Reinheit 99%, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala.) in der Formulierung enthalten sind. Die Suspension wird anschließend wie in Beispiel **10** beschrieben verwirbelt, um einen Schaum zu ergeben, welcher dem im Beispiel **10** beschriebenen Schaum ähnelt.

Beispiel 15

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mit 1,2-Dipamitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin (DPPG)

[0249] Die wie in Beispiel 10 beschrieben hergestellte Formulierung wird verwendet, mit der Abwandlung, dass 1–10 mol% 1,2-Dipamitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin (DPPG) (Reinheit 99%, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala.) in der Formulierung enthalten sind. Die Suspension wird anschließend wie in Beispiel 10 beschrieben verwirbelt, um einen Schaum zu ergeben, welcher dem im Beispiel 10 beschriebenen Schaum ähnelt.

Beispiel 16

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mit 1,2-Dipamitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin (DPPG) und Phosphatidsäure

[0250] Die wie in Beispiel 10 beschrieben hergestellte Formulierung wird verwendet, minder Abwandlung, dass 1–10 mol% 1,2-Dipamitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin (DPPG) (Reinheit 99%, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala.) und 1–5 mol% Phophatidsäure (Reinheit 99%, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala.) in der Formulielung beinhaltet sind. Die Suspension wird anschließend wie in Beispiel 10 beschrieben verwirbelt, um einen Schaum zu ergeben, welcher dem im Beispiel 10 beschriebenen Schaum ähnelt.

Beispiel 17

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mit einem wasserlöslichen Vitamin (Ascorbinsäure)

[0251] Die wie in Beispiel **10** hergestellte Formulierung wird verwendet, mit der Abwandlung, dass 0,5–5,0 mol% Ascorbinsäure (USP-FCC Roche Vitamins and Fine Chemicals, Nutley, New Jersey) in der Formulierung beinhaltet sind. Die Suspension wird anschließend wie in Beispiel 10 beschrieben verwirbelt, um einen recht cremigen Schaum zu ergeben, welcher dem im Beispiel 10 beschriebenen Schaum ähnelt. Ein ähnliche Formulierung wird mit Argon, Stickstoff und Neongas unter Erzielung ähnlicher Ergebnisse hergestellt.

Beispiel 18

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen mit einem wasserlöslichen Vitamin (Ascorbinsäure)

[0252] sDie wie in Beispiel 10 hergestellte Formulierung wird verwendet, mit der Abwandlung, dass 5,0–50 mol% Ascorbinsäure (USP-FCC Roche Vitamins and Fine Chemicals, Nutley, New Jersey) in der Formulierung beinhaltet sind. Die Suspension wird anschließend wie in Beispiel 10 beschrieben verwirbelt, um einen recht cremigen Schaum zu ergeben, welcher dem im Beispiel 10 beschriebenen Schaum ähnelt. Ein ähnliche Formulierung wird mit Argon, Stickstoff und Neongas unter Erzielung ähnlicher Ergebnisse hergestellt.

Beispiel 19

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen aus einer pH-empfindlichen gasförmigen Vorstufe

[0253] 1 Gramm Eiphosphatiylcholin wird in 100 cc physiologischer Kochsalzlösung bei Raumtemperatur suspendiert, um eine Dispersion von multilamminaren Mikrokügelchen-Vesikeln zu ergeben. Die Mikrokügel-

chen werden anschließend in einem Gefäß vorgelegt, zu welchem Natriumhydrogencarbonat (Mallinckrodt, St. Louis Mo) sowie ein Ionophor (A231 **87**) zugegeben werden, was zu Hydrogencarbonatverkapselten Mikrokügelchen führt, welchen diesen Ionophor kontaktieren. Anschließend wird Säure zur externen wässrigen Phase zugegeben, um den pH-Wert in den Vesikeln abzusenken. Es wurde gefunden, dass das in den Vesikeln eingeschlossene Hydrogencarbonat CO_2-Gas und Wasser bildet.

Beispiel 20

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen aus einer temperaturempfindlichen gasförmigen Vorstufe

[0254] Mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen werden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, mit der Abwandlung, dass als gasförmige Vorstufe 2-Methyl-2-buten zugegeben wird. Die anschließende Emulsion/Suspension wird anschließend durch eine Nuclepore (Costar, Pleasanton, Calif.) 0,22 µm Membran bei Raumtemperatur (20°C) filtriert. Nach Temperaturerhöhung auf etwa 39°C wird bemerkt, dass sich Gasblasen bilden, welche mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllt Mikrokügelchen ergeben.

Beispiel 21

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufer gefüllten Mikrokügelchen, welche durch Licht aktiviert werden

[0255] Mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen werden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, mit der Abwandlung, dass eine photoempfindliche Diazoniumverbindung zugegeben wird. Die Probe wird anschließend durch eine Nucleopore (Costar, Pleasanton, Calif.) 0,22 µm Membran bei Raumtemperatur (20°C) filtriert. Nach Beleuchten der Probe mit Licht wird beobachtet, dass eine Gasblasenbildung einsetzt, welche mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen ergibt.

Beispiel 22

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche Chelate zur Behandlung der Psoriasis beinhalten

[0256] Mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen werden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, mit der Abwandlung, dass 250 mg Penicillamin (Bachem, Gardena, Calif.) zur Lipidsuspension hinzugegeben werden. Die Suspension wird anschließend mikrofluidisiert, wie in Beispiel 1 beschrieben, um mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen mit darin verkapseltem Penicillamin zu ergeben. Diese Mischung wird an einem ausgewählten Gewebe angewendet, um einen Überschuss an Kupferionen zu absorbieren und dadurch eine Posriasislesion zu behandeln.

Beispiel 23

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche Chelate zur Behandlung der Wilson-Erkrankung beinhalten

[0257] Mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen werden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, mit der Abwandlung, dass 250 mg des lipophilen Chelats EDTA-EOEA-DP zur Lipidsuspension zugegeben werden. Die Suspension wird anschließend mikrofluidisiert, wie in Beispiel 1 beschrieben wurde, um mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen mit darin verkapseltem Penicillamin zu ergeben. Diese Mischung wird an einem ausgewählten Gewebe eines Patienten angewendet, um überschüssige Kupferionen zu absorbieren, um dadurch den Überschuss an Kupferionen und deren nachteiligen Einfluss zu behandeln.

Beispiel 24

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche lipidlösliche Verbindungen zur Behandlungen der Wilson-Erkrankung beinhalten.

[0258] Mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen werden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, mit der Abwandlung, dass 250 mg Pencillamin (Bachem, Gardena, Calif.) zur Lipidsuspension zugegeben werden. Die Suspension wird anschließend mikrofluidisiert, wie in Beispiel 1 beschrieben ist, um mit

Gas oder mit gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen mit darin verkapseltem Pencillamin zu ergeben. Diese Mischung wird an einem ausgewählten Gewebe angewendet, um überschüssige Kupferionen zu absorbieren und dadurch den Überschuss und die nachteilige Wirkung der Kupferionen zu behandeln.

Beispiel 25

Herstellung von mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllten Mikrokügelchen, welche lipidlösliche Verbindungen zur Behandlung der Wilson-Erkrankung beinhalten

[0259] Mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen werden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, mit der Abwandlung, dass 250 mg Desfenioxamin (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, Wis.) zur Lipidsuspension zugegeben werden. Die Suspension wird anschließend mikrofluidisiert, wie in Beispiel 1 beschrieben ist, um mit Gas oder mit gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen mit dann verkapseltem Pencillamin zu ergeben. Diese Mischung wird an einem ausgewählten Gewebe angewendet, um überschüssige Kupferionen zu absorbieren und dadurch den Überschuss und die nachteilige Wirkung der Kupferionen zu behandeln.

Beispiel 26

Herstellung einer Seife, umfassend mit Gas oder gasförmiger Vorstufe gefüllte Mikrokügelchen, welche im wesentlichen kein restliches Wasservolumen mehr aufweisen

[0260] Das gleiche Verfahren wie in Beispiel 10 wird verwendet, mit der Abwandlung, dass 25 $mg*ml^{-1}$ bis 50 $mg*ml^{-1}$ an Lipid verwendet werden. Zur Formulierung werden zwischen 250 mg und 1 Gramm Xanthangummi (Kelco, San Diego, Cal.) und zwischen 250 mg und 2 Gramm Duponol C (Natriumdodecylsulfat, Witco, Houston, Tex.) zugegeben. Die Mischung wird 10 bis 20 Sekunden lang verwirbelt, um einen cremigen Schaum zu ergeben, welcher bei Anwendung an ein ausgewähltes Gewebe das Gefühl von Weichheit und Cremigkeit erzeugt, welche aber bei Anwendung von Wasser leicht einen Seifenschaum bildet.

Beispiel 27

Herstellung von mit Perfluorpropangas gefüllten Mikrokügelchen mit Lipiddoppelschichten

[0261] Mikrokügelchen, welche mit Gas gefüllte Lipiddoppelschichten enthalten, werden in zwei 20 ml Fläschchen mit 6 ml Verdünnungsmittel, welches normale (physiologische) Kochsalzlösung : Propylenglycol : Glycerin (8 : 1 : 1, v : v : v) enthält. Hierzu wird in einer Lipidendkonzentration, die zwischen 0,25 $mg*ml^{-1}$ und höchstens 50 $mg*ml^{-1}$ schwankt, eine Mischung aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) : Phosphatidsäure : Dipalmitoylphophatidylethanolamin-PEG 5000 in einem Gewichtsverhältnis von 82 : 10 : 8 (w : w : w) hinzugegeben. Diese Proben werden anschließend mit luftdichten und druckhaltenden Septumkappen verschlossen. Sie werden anschließend mindestens drei mal mit Perfluorpropangas (99,99%, Scott Medical Gases, Plumbsteadville, Pa) gespült und evakuiert. Diese Proben werden anschließend entweder in einem Barnstead Steam Sterilizer, Modell C57835 (Barnstead/Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa) 15 Minuten bei 121°C Autoklaven-behandelt, oder ein bis drei mal durch ein Nuclepore-Filter von 0,22 µm (Costar, Pleasanton, Calif.) steril filtriert. Die Proben werden anschließend aus dem Autoklauen entnommen und auf etwas 40°C abkühlen gelassen. Die Proben werden danach mit einem Wig-L-Bug-Verwirbler (Crescent Dental Mfg., Co., Lyons, III.) über einen Zeitraum von zwei Minuten verwirbelt. Die resultierenden Mischungen sind hinsichtlich der Bildung von mit gas gefüllten Mikrokügelchen, welche einem Schaum ähneln, signifikant. Die Größe der Mikrokügelchen, welche mit Gas gefüllte Lipiddoppelschichten umfassen, werden anschließend mit drei Verfahren bestimmt, und zwar auf einem Light obscuration detector von Particle Sizing Systems, Modell 770 (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, Calif.); einem optischen Mikroskop von Reichert-Jung, Modell 150 mit einem Kalibrierungsokkular (Cambridge Instruments, Buffalo, New York); und einem Coulter Modell (Coulter-Industrie, Luton Beds, England). Die Proben zeigen ein mittleres Zahlenmittel der Größe von etwas 5 bis 7 µm, wobei mindestens 95% der Teilchen kleiner als 10 µm sind.

Beispiel 28

Herstellung von mit Perfluorbutan gefüllten Mikrokügelchen, welche mit Gas gefüllte Lipiddoppelschichten umfassen

[0262] Das selbe Verfahren wie in Beispiel 27 wird angewandt, mit der Abwandlung, dass Perfluorpropan durch identische Volumina an Perfluorbutan (97+% Reinheit, Flura Corporation, Nashville, Tenn.) ersetzt wird.

Dies ergibt mit Perfluorbutangas gefüllte Mikrokügelchen mit im wesentlichen den selben Dimensionen.

Beispiel 29

Bildung von Mikrokügelchen, welche mit Perfluorpentangas gefüllte Lipiddoppelschichten umfassen

[0263] Es wird das selbe Verfahren wie in Beispiel 27 verwendet, mit der Abwandlung, dass das Perfluorpropan durch etwas 100 µL Perfluorpentan (Flura Corp., Nashville, Tenn.) sowie Luft ersetzt wird. Es wird ein Schaum beobachtet, der dem im Beispiel 27 beschriebenen Schaum ähnelt.

Beispiel 30

Bildung von Mikrokügelchen, welche die mit Perfluorethangas gefüllte Lipiddoppelschichten umfassen.

[0264] Es wird das selbe Verfahren wie in Beispiel 27 verwendet, mit der Abwandlung, dass das Perfluorpropan durch ein identisches Volumen an Perfluorethan ersetzt wird (Canadian Liquid Air, Ltd., Montreal, Canada). Es wird ein Schaum beobachtet, welcher dem im Beispiel 27 beschriebenen Schaum ähnelt.

Beispiel 31

Bildung von mit Perfluorpropangas gefüllten Mikrokügelchen, die Progesteron verkapseln

[0265] Es wird das selbe Verfahren wie in Beispiel 27 verwendet, mit der Abwandlung, dass 4 mg Progesteron zur Formulierung hinzugegeben werden. Es wird ein Schaum beobachtet, welcher dem im Beispiel 27 beschriebenen Schaum ähnelt. Zwei (2) ml der Mischung werden vor einem Aufziehen mit einer Spritze geschüttelt, dann wird aufgezogen und subkutan auf der hohlhandseitigen Oberfläche des Unterarms eines menschlichen Freiwilligen (Frau) injiziert. Die subkutane Verabreichung wird einmal alle zwei bis sechs Monate wiederholt.

Beispiel 32

Bildung von mit Gas gefüllten Mikrokügelchen mit einem Anitoxidans und Sauerstofffänger

[0266] Zu einem 50 ml Verwirbelungsgefäß werden 4,4 ml einer 27,2 Gew.%-igen wässrigen Mischung aus Ascorbinsäure (Vitamin C, Spectrum Pharmaceutical, Gardena, CA) (ein Antioxidans) zugegeben. Hierzu werden 100 µL einer Lösung zugegeben, welche 55000 Einheiten Glukoseoxidase (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) (ein Sauerstofffänger) und 4125 Einheiten Katalase (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) zugegeben. Zu dieser Lösung werden anschließend 500 µL einer 5%-igen (wt : vol) wässrigen Lösung von Dextrose (Spectrum Pharmaceutical, Gardena, CA) zugegeben. Die resultierende Mischung wird mit Stickstoffgas gespült und 500 mg an trockenem Distearoylphosphatidylcholin (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama) werden zugegeben. Die resultierende Formulierung wird anschließend mit einer Stickstoffdecke gespült. Anschließend wird ein mL einer 1%-igen wässrigen Cetylalkohollösung zugegeben, erneut mit Stickstoff gespült und schließlich auf einem Verwirbelungsmischer (VWR Scientific, Cerritos, CA) 15 Minuten lang venniirbelt, um einen dicken, kremig weißen Schaum aus mit Gas gefüllten Mikrokügelchen zu ergeben.

Beispiel 33

Bildung von mit Gas gefüllten Mikrokügelchen mit einem Anitoxidans und einem Sauerstofffänger

[0267] Zu einem 50 ml Verwirbelungsgefäß werden 4,4 ml einer 22,5 Gew.%-igen wässrigen Mischung aus Ascorbinsäure (Vitamin C, Spectrum Pharmaceutical, Gardena, CA) (ein Antioxidans) zugegeben. Hierzu werden 100 µL einer Lösung zugegeben, welche 55000 Einheiten Glukoseoxidase (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) (ein Sauerstofffänger) und 4125 Einheiten Katalase (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) zugegeben. Zu dieser Lösung werden anschließend 500 µL einer 5%-igen (wt : vol) wässrigen Lösung von Dextrose (Spectrum Pharmaceutical, Gardena, CA) zugegeben. Die resultierende Mischung wird mit Stickstoffgas gespült und 500 mg an trockenem Distearoylphosphatidylcholin (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama) werden zugegeben. Die resultierende Formulierung wird anschließend mit einer Decke aus Perfluorbutan (Flurs Corporation, Newport, TN) gespült. und auf einem Verwirbelungsmischer (VWR Scientific, Cerritos, CA) 15 Minuten lang verwirbelt, um einen dicken, kremig weißen Schaum aus mit Gas gefüllten Mikrokügelchen zu ergeben.

[0268] Die Offenbarung von jedem Patent, jeder Patentanmeldung und jeder hier in diesem Dokument zitier-

ten oder beschriebenen Veröffentlichung werden hier mittels Bezugnahme in ihrer Gesamtheit inkorporiert.
[0269] Verschiedene Modifikation der Erfindung werden sich zusätzlich zu den hier beschriebenen dem Fachmann aufgrund der vorausgegangenen Beschreibung erschließen. Derartige Modifikation sollen auch in den Umfang der nachfolgenden Ansprüche fallen.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung zur topischen oder subkutanen Anwendung auf ein ausgewähltes Gewebe eines Patienten, umfassend einen Schaum, welcher mit Gas oder mit temperaturaktivierten gasförmigen Vorstufen gefüllte Liposomen umfaßt, wobei die Liposomen ein therapeutisches oder kosmetisches Mittel, darin eingeschlossen oder damit verknüpft, aufweisen und das Gas oder die temperaturaktivierte gasförmige Vorstufe einen Perfluorkohlenstoff, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Tetrafluormethan, Hexafluorethan, Octafluorpropan, Decafluorbutan, Dodecafluorpentan, Hexafluorcyclopropan, Octafluorcyclobutan und Decafluorcyclopentan, umfaßt.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Liposomen ein Lipid, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Fettsäuren, Lysolipiden, Phosphatidylcholinen, Phosphatidylethanolaminen, Phosphatidylserinen, Phosphatidylglycerolen, Phosphatidylinositolen, Sphingolipiden, Glycolipiden, Glucolipidsulfatiden, Glycosphingolipiden, Phosphatidsäuren, Palmitinsäuren, Stearinsäuren, Arachidonsäuren, Ölsäuren, Polymere tragenden Lipiden, sulfonierte Monosaccharide tragenden Lipiden, sulfonierte Disacchande tragenden Lipiden, sulfonierte Oligosaccharide tragenden Lipiden, sulfonierte Polysaccharide tragenden Lipiden, Cholesterolen, Tocopherolen, Lipiden mit etherverknüpften Fettsäuren, Lipiden mit esterverknüpften Fettsäuren, polymerisierten Lipiden, Diacetylphosphaten, Dicetylphosphaten, Stearylaminen, Cardiolipin, Phospholipiden mit Fettsäuren von 6 bis 8 Kohlenstoffen in der Länge, synthetischen Phospholipiden mit asymmetrischen Acylketten, Ceramiden, nichtionischen Lipiden, Sterolestern mit aliphatischen Säuren, Sterolestern von Zuckersäuren, Estern von Zuckersäuren, Estern von Zuckeralkoholen, Estern von Zuckern, Estern von aliphatischen Säuren, Saponinen, Glyceroldilaurat, Glyceroltrilaurat, Glyceroldipalmitat, Glycerol, Glycerolestern, Alkoholen von 10 bis 30 Kohlenstoffatomen in der Länge, 6-(5-Cholesten-3β-yloxy)-1-thio-β-D-galactopyranosid, Digalactosyldiglycerid, 6-(5-Cholesten-3β-yloxy)hexyl-6-amino-6-desoxy-1-thio-β-D-galactopyranosid, 6-(5-Cholesten-3β-yloxy)hexyl-6-amino-6-desoxy-1-thio-α-D-mannopyranosid, 12-(((7'-Diethylaminocumarin-3-yl)carbonyl)methylamino)octadecansäure, N-[12-(((T-Diethylaminocumarin-3-yl)carbonyl)methylamino)octadecanoyl]-2-aminopalmitinsäure, Cholesteryl(4'-trimethylammonio)butanoat, N-Succinyldioleoylphosphatidylethanolamin, 1,2-Dioleoyl-sn-glycerol, 1,2-Dipalmitoyl-sn-3-succinylglycerol, 1,3-Dipalmitoyl-2-succinylglycerol, 1-Hexadecyl-2-palmitoylglycerophosphoethanolamin, Palmitoylhomocystein, kationischen Lipiden, N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N-,N,N-trimethylammoniumchlorid, 1,2-Dioleoyloxy-3-(trimethylammonio)propan, 1,2-Dioleoyl-3-(4'-trimethyl-ammonio)butanoyl-sn-glycerol, kationischen Polymere tragenden Lipiden, Alkylphosphonaten, Alkylphosphinaten und Alkylphosphiten, umfassen.

3. Zusammensetzung nach einem vorhergehenden Anspruch, ferner umfassend Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus mit der Nahrung aufgenommenen Ölen, gemischten Micellensystemen, Viskositätsmodifizierungsmitteln, Emulgierungs- und/oder Solubilisierungsmitteln, Suspendier- und/oder viskositätssteigernden Mitteln, synthetischen Suspendiennitteln und tonizitätssteigernden Mitteln.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei die mit der Nahrung aufgenommenen Öle aus der Gruppe, bestehend aus Erdnußöl, Kanolaöl, Olivenöl, Safloröl und Kornöl ausgewählt sind, wobei die gemischten Micellensysteme aus Lauryltrimethylammoniumbromid, Cetyltrimethylammoniumbromid, Myristyltrimethylammoniumbromid, (Tetradecyl-), Alkyldimethylbenzylammoniumchlorid (Alkyl = C_{12}, C_{14}, C_{15}), Benzyldimethyldodecylammoniumbromid/Chlorid, Benzyldimethylhexadecylammoniumbromid/chlorid, Benzyldimethyltetradecylammoniumbromid/chlorid, Cetyldimethylethylammoniumbromid/chlorid und Cetylpyridiniumbromid/chlorid, ausgewählt sind, wobei die Viskositätsmodifizierungsmittel aus der Gruppe, bestehend aus Kohlenhydraten und ihren phosphorylierten und sulfonierten Derivaten, Polyethern mit einem Molekulargewicht in dem Bereich von zwischen 400 und 100 000, Di- und Trihydroxyalkanen und ihren Polymeren mit einem Molekulargewicht in dem Bereich von zwischen 200. und 50 000, ausgewählt sind, wobei die Emulgierungs- und/oder Solubilisierungsmittel aus der Gruppe, bestehend aus Akazienöl, Cholesterol, Diethanolamin, Glycerylmonostearat, Lanolinalkoholen, Lecithin, Mono- und Diglyceriden, Monoethanolamin, Ölsäure, Oleoylalkohol, Poloxamer, Polyoxyethylen 50 Stearat, Polyoxyl 35 Castoröl bzw. Ricinusöl, Polyoxyl 10 Oleylether, Polyoxyl 20 Cetosteanlether, Polyoxyl 40 Stearat, Polysorbat 20, Polysorbat 40, Polysorbat 60, Polysorbat 80, Propylenglycoldiacetat, Propylenglycolmonostearat, Natriumlaurylsulfat, Natriumstearat, Sorbitanmonolaurat, Sorbitanmonooleat, Sorbitanmonopalmitat, Sorbitanmonostearat, Stearinsäure, Trolamin und emulgierenden Wachsen, ausgewählt sind, wobei die Suspendiermittel und/oder viskositätssteigernde Mittel aus der Gruppe, bestehend aus

Akazienöl, Agar, Alginsäure, Aluminiummonostearat, Bentonit, gereinigtem Bentonit, Magmabentonit, Carbomer 934P, Carboxymethylcellulosecalcium, Carboxymethylcellulosenatrium 12, Carboxymethylcellulosenatrium, Carragen, makrokristalliner Cellulose, Dextran, Gelatine, Guargum, Veegum, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Magnesiumaluminiumsilikat, Methylcellulose, Pektin, Polyethylenoxid, Polyvinylalkohol, Povidon, Propylenglycolalginat, Siliciumdioxid, Siliciumdioxid, kolloidalem Zinkoxid, Natriumalginat, Traganth, Xanthangummi, α-D-Gluconolacton, Glycerol und Mannitol, ausgewählt sind, wobei die synthetischen Suspendiermittel aus der Gruppe, bestehend aus Polyethylenglycol, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, Polypropylenglycol und Polysorbat, ausgewählt sind, und wobei die tonizitätssteigemden Mittel aus der Gruppe, bestehend aus Sorbitol, Propylenglycol und Glycerol, ausgewählt sind.

5. Zusammensetzung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei die Liposomen Dipalmitoylphosphatidylethanolamin und Phosphatidsäure in einer Menge von 0,5 bis 30 Molprozent umfassen.

6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Liposomen aus einer Zusammensetzung, umfassend Dipalmitoylphosphatidylcholin und Distearoylphosphatidylcholin in einer Menge von 70 bis 100 Molprozent, hergestellt sind.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Liposomen (i) ein neutrales Lipid, (ii) ein negativ geladenes Lipid und (iii) ein hydrophile Polymere tragendes Lipid umfassen.

8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei die Menge des negativ geladenen Lipides größer als 1 Molprozent des gesamten vorliegenden Lipides ist und die Menge des ein hydrophiles Polymer tragenden Lipides größer als 1 Molprozent des gesamten vorliegenden Lipides ist.

9. Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, wobei das negativ geladene Lipid Phosphatidsäure ist und wobei das hydrophile Polymer ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts von etwa 400 bis etwa 100 000 aufweist und kovalent an das Lipid gebunden ist.

10. Kosmetische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei das hydrophile Polymer aus der Gruppe, bestehend aus Polyethylenglycol, Polypropylenglycol, Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon und Copolymeren davon, ausgewählt ist, und wobei das Lipid des ein hydrophiles Polymer tragenden Lipides aus der Gruppe, bestehend aus Dipalmitoylphosphatidylethanolamin und Distearoylphosphatidylethanolamin, ausgewählt ist.

11. Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die Liposomen etwa 77,5 Molprozent Dipalmitoylphosphatidylcholin, etwa 12,5 Molprozent Dipalmitoylphosphatidsäure und etwa 10 Molprozent Dipalmitoylphosphatidylethanolamin-Polyethylenglycol 5000 umfassen.

12. Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei die Liposomen etwa 82 Molprozent Dipalmitoylphosphatidylcholin, etwa 10 Molprozent Dipalmitoylphosphatidsäure und etwa 8 Molprozent Dipalmitoylphosphatidylethanolamin-Polyethylenglycol 5000 umfassen.

13. Zusammensetzung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das therapeutische oder kosmetische Mittel ein therapeutisches Mittel ist, welches aus der Gruppe, bestehend aus Antipilzmitteln, Hormonen, Vitaminen, Peptiden, Enzymen, antiallergischen Mitteln, Antikoagulierungsmitteln, Antituberkulosemitteln, Antivirusmitteln, Antibiotika, entründungshemmenden Mitteln, Antiprotozoenmitteln, lokalen Anästhetika, Wachstumsfaktoren, kardiovaskulären Mitteln, Diuretika, radioaktiven Teilchen, Scopolamin, Nikotin, Methylnikotinat, Mechlorisondimtyrat, Naloxon, Methanol, Coffein, Salicylsäure und 4-Cyanophenol, ausgewählt ist.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, wobei die Antipilzmittel aus der Gruppe, bestehend aus Ketoconazol, Nystatin, Griseofulvin, Flucytosin (5fc), Miconazol und Amphotericin B, ausgewählt sind, wobei die Hormone aus der Gruppe, bestehend aus Wachstumshormon, dem Melanocyten stimulierenden Hormon, Estradiol, Beclomethasondipropionat, Betamethason, Betamethasonacetat und Betamethasonnatriumphosphat, Vetamethasondinatriumphosphat, Vetamethasonnatriumphosphat, Cortisonacetat, Dexamethason, Dexamethasonacetat, Dexamethasonnatriumphosphat, Flunisolid, Hydrocortison, Hydrocortisonacetat, Hydrocortisoncypionat, Hydrocortisonnatriumphosphat, Hydrocortisonnatriumsuccinat, Methylprednisolon, Methylprednisolonacetat, Methylprednisolonnatriumsuccinat, Paramethasonacetat, Prednisolon, Prednisolonacetat, Prednisolonnatriumphosphat, Prednisolontebutat, Prednison, Triamcinoion, Triamcinolonacetonid, Triamcinolondiacetat, Triamcinolonhexacetonid und Fludrocortisonacetat, ausgewählt sind, wobei die Vitamine aus der Gruppe, bestehend aus cyanocobalamin neinoic acid, Retinoiden und Derivaten davon, Retinolpalmitat, Ascorbin-

säure und α-Tocopherol ausgewählt sind, wobei die Peptide und Enzyme aus der Gruppe, bestehend aus Mangansuperoxiddismutase und alkalischer Phosphatase, ausgewählt sind, wobei das antiallergische Mittel Amelexanox ist, wobei die Antikoalugierungsmittel aus der Gruppe, bestehend aus Phenprocumon und Heparin, ausgewählt sind, wobei die Antituberkulosemittel aus der Gruppe, bestehend aus Paraaminosalicylsäuren, Isoniazid, Capreomycinsulfatcycloserin, Ethambutolhydrochloridethionamid, Pyrazinamid, Rifampin und Streptomycinsulfat, ausgewählt sind, wobei die antiviralen Mittel aus der Gruppe, bestehend aus Acyclovir, Amantadinazidothymidin, Ribavarin und Vidarabinmonohydrat ausgewählt sind, wobei die Antibiotika aus der Gruppe, bestehend aus Dapson, Chloramphenicol, Neomycin, Cefachlor, Cefadroxil, Cephalexin, Cephradinerythromycin, Clindamycin, Lincomycin, Amoxicillin, Ampicillin, Bacampicillin, Carbenicillin, Dicloxacillin, Cyclacillin, Picloxacillin, Hetacillin, Methicillin, Nafcillin, Oxacillin, Penicillin G, Penicillin V, Ticarcillinrifampin und Tetracyclin, ausgewählt sind, wobei die entzündungshemmenden Mittel aus der Gruppe, bestehend aus Diflunisal, Ibuprofen, Indomethacin, Meclofenamat, Mefenamsäure, Naproxen, Oxyphenbutazon, Phenylbutazon, Piroxicam, Sulindac, Tolmetin, Aspirin und Salicaten, ausgewählt sind, wobei die Antiprotozoenmittel aus der Gruppe, bestehend aus Chloroquin, Hydroxychloroquin, Metronidazol, Chinin und Megluminantimonat, ausgewählt sind, wobei die Lokalanästhetika aus der Gruppe, bestehend aus Bupivacainhydrochlorid, Chloroprocainhydrochlorid, Etidocainhydrochlorid, Lidocainhydrochlorid, Mepivacainhydrochlorid, Procainhydrochlorid und Tetracainhydrochlorid, ausgewählt sind, wobei die Wachstumsfaktoren aus der Gruppe, bestehend aus dem epidermalen Wachstumsfaktor, dem sauren Fibroblastenwachstumsfaktor, dem basischen Fibroblastenwachstumsfaktor, dem insulinähnlichen Wachstumsfaktortyp 1 und dem insulinähnlichem Wachstumsfaktor Typ II, dem Nervenwachstumsfaktor, dem Thrombozytenwachstumsfaktor, dem Stammzellenfaktor und dem transfonnierenden Wachstumsfaktor der α-Familie oder dem iransformierenden Wachstumsfaktor der β-Familie, ausgewählt sind, wobei die kardiovaskulären Mittel aus der Gruppe, bestehend aus Clonidin, Propranolol, Lidocain, Nicardipin und Nitroglycerin, ausgewählt sind, wobei die Diuretika aus der Gruppe, bestehend aus Mannitol und Harnstoff, ausgewählt sind, und wobei die radioaktiven Teilchen aus der Gruppe, bestehend aus Strontium, Iod, Rhenium und Yttrium, ausgewählt sind. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das therapeutische oder kosmetische Mittel ein therapeutisches Mittel ist, welches aus der Gruppe, bestehend aus

(1) Peptiden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem Melaninkonzentrierenden Hormon, Melanin-stimulierenden Hormon, Trypsininhibitor, Bowman Burk Inhibitor, dem Lutenisierungshonnon freisetzenden Hormon, Bombesin, Cholecystokinin, Insulin, Gastrin, Endorphinen, Enkephalinen, Wachstumshormon, Prolactin, Oxytocin, dem Follikelstimulierenden Hormon, dem menschlichen Choriongonadotropin, Corticotropin, β-Lipotropin, γ-Lipotropin, Calcitonin, Glucagon, Thyrotropin, Elastin, Cyclosporin und Collagen und Antagonisten und Analogen davon;

(2) monoklonalen Antikörpern;

(3) Faktoren, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Hyaluronsäure, Heparin und Heparinsulfat;

(4) Antisense-Peptiden und Antisense-Oligonukleotiden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Antisense-Oligonukleotid, welches zum Binden an die DNA befähigt ist, die mindestens einen Teil von Ras kodiert, einem Antisense-Oligonukleotid, welches zum Binden an die DNA befähigt ist, welche mindestens einen Teil des basischen Fibroblastenwachstumsfaktor kodiert, und dem Antisense-Ras/p53-Peptid;

(5) Immunsuppressive Mittel und entzündungshemmende Mittel;

(6) Chelatbildner und chelatbildende Mittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Penicillinamin, Citrat, Ascorbat, Diethylentriaminpentaessigsäure, Dihydroxypropylenethylen-Diamin, Cyclohexandiamintetraessigsäure, Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Etidronsäure, Dimethylsulfoxid, Dipyridoxylethylendiamindiacetat-Eiphosphat, N,N'-(1,2-Ethandiyl-bis(oxy-2,1-phenylen))bis(N-(carboxymethyl), Aminophenoltriessigsäure, Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylendiamin, Cyaninen, und Derivaten und Salzen davon; und

(7) DNA, die mindestens einen Teil der folgenden Gene kodiert: HLA, Dystrophin, CFTR, Interleukin-2, Tumomekrosefaktor, Adenosindesaminase, HDL-Rezeptor, Thymidinkinase, NLA-B7, Interleukin-4, das Melanozyten stimulierende Hormongen und das Melanin konzentrierende Hormongen, ausgewählt ist.

15. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das therapeutische oder kosmetische Mittel ein kosmetisches Mittel ist, welches aus der Gruppe, bestehend aus Sonnenschutzmitteln, Vitamin A, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E, Vitamin K, Betakarotin, Collagen, Elastin, Retinsäure, Retinolpalmitat, Aloe vera, Lanolin, Hyaluronsäure und Nukleosiden, ausgewählt ist.

16. Zusammensetzung nach Anspruch 16, wobei das kosmetische Mittel ein Sonnenschutzmittel ist, welches aus der Gruppe, bestehend aus 5% Isobutyl-p-aminobenzoat, 5% Diallyltrioleat, 2,5% Monoglyceryl-p-aminobenzoat, 4% Propylenglycol-p-aminobenzoat und einer Zusammensetzung, umfassend 2% Benzylsalicylat und 2% Benzylcinnamat, ausgewählt ist.

17. Zusammensetzung nach einem vorherigen Anspruch, umfassend eine oder mehrere Verbindungen, ausgewählt aus den folgenden:
(1) bakteriostatische Mittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Benzalkoniumchlorid, Benzethoniumchlorid, Benzoesäure, Benzylalkohol, Butylparaben, Cetylpyridinumchlorid, Chlorobutanol, Chlorocresolmethylparaben, Phenol, Kaliumbenzoat, Kaliumsorbat, Natriumbenzoat und Sorbinsäure;
(2) Antioxidanzien, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Tocopherol, Ascorbinsäure und Ascorbylpalmitat;
(3) Konservierungsmittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Parabenen, quartären Ammoniumverbindungen, Alkoholen, Phenolen und essentiellen Ölen;
(4) Säuren, Basen, Puffer und Neutralisierungsmittel;
(5) Feuchtigkeitsgehalt-kontrollierende Mittel und Feuchthaltemittel;
(6) Salbengrundlagen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Lanolin, wasserfreiem Lanolin, hydrophilen Salben, weißen Salben, gelben Salben, Polyethylenglycolsalben, Rohvaseline, hydrophiler Rohvaseline, Alvolen, Rosenwassersalben und Squalen;
(7) Suspendier- und viskositätssteigernde Mittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Akazienöl, Agar, Alginsäure, Aluminiummonostearat, Bentonit, gereinigtem Bentonit, Magmabentonit, Carbomer 934P, Carboxymethylcellulosecalcium, Carboxymethylcellulosenatrium 12, Carboxymethylcellulosenatrium, Canagen, feinkristalliner Cellulose, Dextrin, Gelatine, Guargum, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Magnesiumaluminiumsilikat, Methylcellulose, Pektin, Polyethylenoxid, Polyvinylalkohol, Povidon, Propylenglycolalginat, Siliciumdioxid, Siliciumdoxid, kolloidalem Zinkoxid, Natriumalginat, Traganth und Xanthangummi:
(8) die Hautabsorption verstärkende Mittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Pynolidonen, Fettsäuren, Sulfoxiden, Aminen, Terpenen, Terpenoiden, grenzflächenaktiven Mitteln, Alkoholen, Harnstoff, cyclischen ungesättigten Hamstoffanalogen, Glycolen, Azon, n-Alkoholen, n-Alkanen, Orgelase und Alphadermcreme;
(9) Grundlagen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Glycertn, Propylenglycol, Isopropylmyristat, Harnstoff in Propylenglycol, Ethanol und Wasser, Polyethylenglycol, und
(10) andere Mittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Glycerin, Hexylenglycol, Sorbitol, Propylenglycol, Calciumsilikat, Steifheitsmitteln, ölhaltigen Vehikeln, Färbemitteln, Herstellungshilfsstoffen, Schaummitteln.

18. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Gas oder die gasförmige Vorstufe Perfluorpropan ist.

19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei das Gas oder die gasförmige Vorstufe Perfluorbutan ist.

20. Zusammensetzung nach einem. der Ansprüche 1 bis 18, wobei das Gas oder die gasförmige Vorstufe Perfluorpentan ist.

21. Zusammensetzung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei die Liposomen ferner Stickstoff umfassen.

22. Zusammensetzung nach einem vorherigen Anspruch, wobei die Liposomen ein polymerisiertes Lipid umfassen.

23. Zusammensetrung nach einem vorherigen Anspruch, wobei die Liposomen eine Monoschicht umfassen.

24. Zusammensetzung nach einem vorherigen Anspruch, wobei die Liposomen aus lyophilisierten Lipiden hergestellt sind.

25. Zusammensetzung nach einem vorherigen Anspruch, wobei der Schaum ferner ein grenzflächenaktives Mittel umfaßt.

26. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 26 für die Herstellung eines Medikamentes zur Verwendung in einem Verfahren für die topische oder subkutane Verabreichung eines aktiven Inhaltsstoffes an ein ausgewähltes Gewebe eines Patienten, umfassend den Schritt der topischen oder subkutanen Verabreichung der Zusammensetzung an das Gewebe des Patienten.

27. Verwendung nach Anspruch 27, wobei die Verabreichung topisch ist.

28. Verwendung nach Anspruch 27, wobei die Verabreichung subkutan ist.

29. Verwendung nach Anspruch 27, 28 oder 29, wobei die Verabreichung die Bildung eines Depots ergibt.

30. Verwendung nach Anspruch 27, wobei das Gewebe humane Haut ist.

31. Verwendung nach Anspruch 27, wobei das Gewebe humanes Lungengewebe ist.

32. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das humane Lungengewebe aus Bronchiolen und Alveolen ausgewählt ist.

33. Verwendung nach Anspruch 32, wobei die topische Verabreichung unter Verwendung eines Zerstäubers durchgeführt wird.

34. Verwendung nach einem der Anspreche 27 bis 34, wobei die Zusammensetzung mit temperaturaktivierten gasförmigen Vorstufen gefüllte Liposomen umfaßt und das Verfahren ferner das Zulassen umfaßt, daß die gasförmigen Vorstufe einen Phasenübergang von einer Flüssigkeit in ein Gas eingeht.

35. Verwendung nach Anspruch 35, wobei die temperaturaktivierte gasförmige Vorstufe einen Phasenübergang von dem flüssigen in das gasförmige Stadium als ein Ergebnis der normalen Körpertemperatur des Patienten eingeht.

36. Verwendung nach Anspruch 36, wobei das Gewebe humane Haut mit einer normalen Temperatur von etwa 37°C ist und wobei die gasförmige Vorstufe den Phasenübergang von dem flüssigen in das gasfönrige Stadium bei oder unter 37°C eingeht.

37. Verwendung nach Anspruch 27, wobei das Gewebe humane Haut ist und das therapeutische oder kosmetische Mittel hautkonditionierende Eigenschaften aufweist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

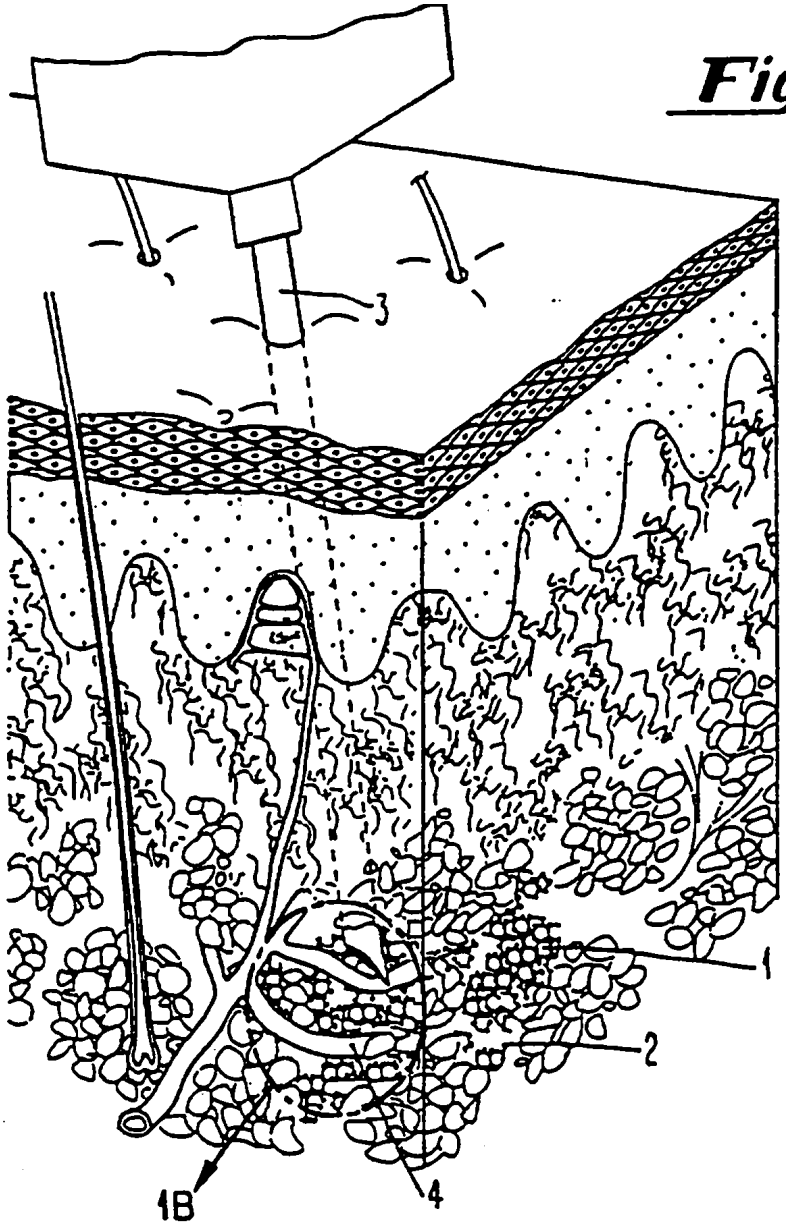


Fig. 1A

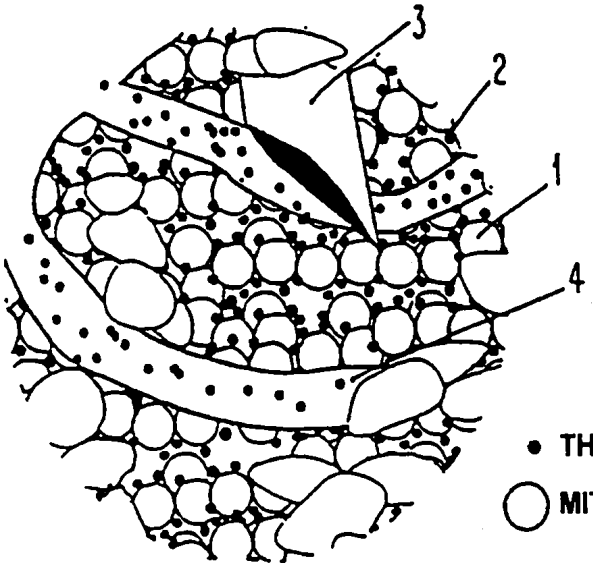


Fig. 1B

• THERAPEUTISCHES MITTEL (2)

○ MIT GAS GEFÜLLTE MIKROKÜGELCHEN (1)

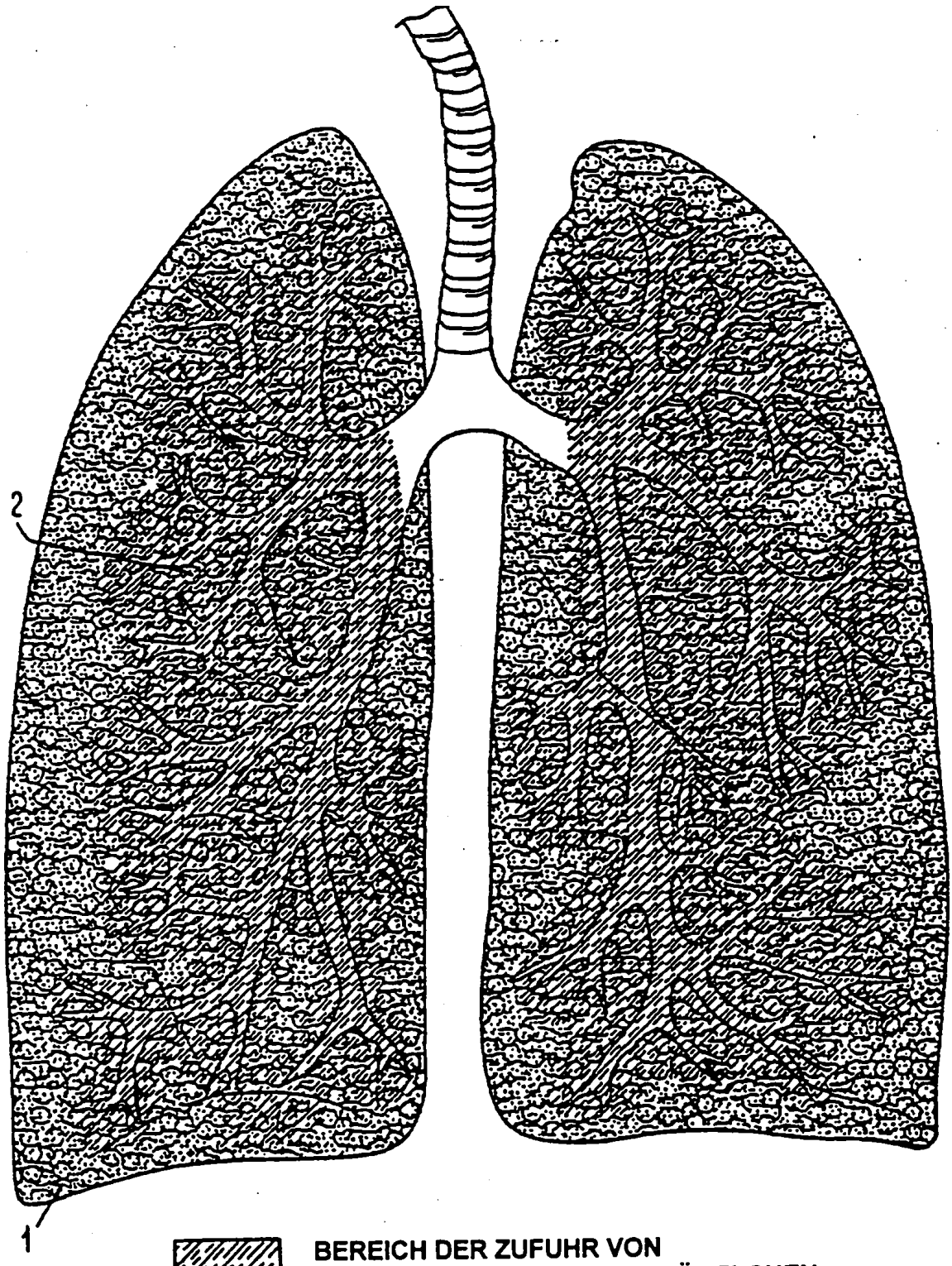

2
1
BEREICH DER ZUFUHR VON
KONVENTIONELLEN MIKROKÜGELCHEN
BEREICH DER ZUFUHR VON
MIT GAS GEFÜLLTEN MIKROKÜGELCHEN

Fig. 2