

(19)



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: A 61 K 9/16
// A 61 K 9/52

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



(12) PATENTSCHRIFT A5

(11)

629 666

(21) Gesuchsnummer: 12764/76

(22) Anmeldungsdatum: 08.10.1976

(30) Priorität(en): 09.10.1975 US 621145

(24) Patent erteilt: 14.05.1982

(45) Patentschrift
veröffentlicht: 14.05.1982

(73) Inhaber:
Minnesota Mining and Manufacturing Company,
Saint Paul/MN (US)

(72) Erfinder:
Anthony Francis Yapel, jun., Saint Paul/MN (US)

(74) Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

(54) Injizierbare Verabreichungsform für Medikamente und Verfahren zur Herstellung.

(57) Die Verabreichungsform enthält feine, in Form einer Suspension injizierbare Kügelchen aus vernetztem Serumalbumin, die homogen eingeschlossen 2 bis 70 %, bezogen auf das Gewicht der Kügelchen, eines nicht radioaktiven organischen Medikaments enthalten, das in Wasser von 37°C eine Löslichkeit von mindestens 0,01 % aufweist. Die Vernetzung des Serumalbumins der Kügelchen ist derart, dass sie den Wirkstoff erst schnell und dann, in einer zweiten zeitlichen Phase, langsam abgeben. Zur Herstellung kann man aus einer Kanüle eine wässrige, das Medikament dispergiert enthaltende Serumalbuminlösung in ein bewegtes Pflanzenölbad einfließen lassen, das einen Vernetzer für das Serumalbumin sowie einen lipophilen trocknenden Alkohol enthält, oder in ein heisses Pflanzenölbad, worin eine thermische Vernetzung (Denaturierung) des Serumalbumins stattfindet.

PATENTANSPRÜCHE

1. Zur parenteralen Injektion geeignete Verabreichungsform für Medikamente, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Kügelchen aus vernetztem Serumalbumin, die als Matrix homogen in sich eingeschlossen 2 bis 70%, bezogen auf das Gewicht der Kügelchen, eines nichtradioaktiven organischen Medikaments enthalten, das zu mindestens 0,01% bei 37 °C wasserlöslich ist, und dass in den Kügelchen das Serumalbumin derart vernetzt ist, dass es den Wirkstoff in zeitlich zweiphasiger Weise freizusetzen imstande ist.

2. Verabreichungsform nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kügelchen in einem zur intravaskulären Injektion geeigneten, pharmazeutisch zulässigen Medium dispergiert sind.

3. Verfahren zur Herstellung einer Verabreichungsform in Kügelchen gemäss Anspruch 1 durch Injektion einer wässrigen Lösung des Serumalbumins in ein bewegtes Bad aus Pflanzenöl und nachträgliche Isolierung der Kügelchen, dadurch gekennzeichnet, dass in der Serumalbuminlösung das genannte Medikament dispergiert ist und das Ölbad einen lipophilen trocknenden Alkohol und Glutaraldehyd oder Formaldehyd enthält.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Verabreichungsform für Medikamente, die zur parenteralen Injektion in den Körper vorgesehen ist. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Verabreichungsform unter Einverleiben von Arzneimitteln in eine poröse Trägermatrix, woraus eine zeitlich zweiphasige Abgabe des Arzneimittels nach der Einführung in den Körper resultiert.

In der Medizin ist seit langem der Bedarf an einer wirk-samen Möglichkeit zur Steuerung der Arzneimittelabgabe im Körper bekannt, derart, dass das Arzneimittel weniger häufig verabreicht werden muss, während gleichzeitig stetige therapeutische Wirkstoffkonzentrationen im Blutstrom des Patienten aufrechterhalten werden.

Versuche zur Steuerung der Arzneimittelabgabe sind bei oralen Präparaten teilweise erfolgreich gewesen. Es wurden verschiedene Überzüge und Kapseln entwickelt, mit denen der Wirkstoff umgeben wird und die seine Abgabe verzögern.

Die gesteuerte Abgabe von parenteral verabreichten Arzneimitteln, insbesondere intravaskulär verabreichten Stoffen, stellte grössere Probleme.

Gewöhnlich erfordert die intravaskuläre Injektion eine sorgfältige Kontrolle der Dosierung. Da der Wirkstoff nach intravaskulärer Injektion dem Körper sofort zur Verfügung steht, können Überdosierungen bei toxischen Wirkstoffen gefährliche Komplikationen verursachen. Die intravaskuläre Art der Verabreichung ist bisher auch auf die Verabreichung löslicher Wirkstoffe beschränkt wegen der Gefahr von Embolien bei der Injektion unlöslicher Teilchen. Langsam ab-gabende Arzneimittelformulierungen zur intravaskulären Verabreichung sind bisher nicht vorhanden.

Die GB-PS 931 532 beschreibt ein Verfahren zur Umkapselung von Wirkstoffen in Mikrokapseln aus einem ge-liebaren hydrophilen Kolloid durch ein Verfahren kom-plexer Ausflockung. Das Kolloid bildet eine Membran um den Arzneimittelkern. Es wird vorgeschlagen, die Permeabi-lität der Membran so auszubauen, dass eine allmähliche Wirkstoffabgabe erfolgt.

Die US-PS 3 541 201 beschreibt eine injizierbare Sub-stanz, wobei der Wirkstoff in die innere Struktur eines meta-

bolisierbaren proteinartigen Trägers einverleibt ist. Die Trä-gerteilchen werden als Suspension in einem geeigneten nicht-wässrigen Medium injiziert. Auf die metabolisierbaren Trä-gerteilchen wirken die Enzyme der Körperflüssigkeiten ein, und als Ergebnis davon werden die eingearbeiteten Wirk-stoffe langsam abgegeben.

Die US-PS 3 773 919 und 3 887 699 beschreiben For-mulierungen aus Polylactid und Wirkstoff, die parenteral verabreicht werden können und eine langsame, stetige Ab-gabe des Wirkstoffs während eines bestimmten Zeitraums er-möglichen.

Eine Hauptschwierigkeit in Verbindung mit der lang-samen Abgabe injizierbarer Arzneimittelformulierungen ge-mäss Stand der Technik besteht darin, dass die Abgabegeschwindigkeit häufig nicht den Bedürfnissen des Patienten entspricht. In der Medizin ist bekannt, dass zur Erzeugung des maximalen therapeutischen Effekts eines Arzneimittels dieses eine optimale Konzentration im Blutstrom des Patien-ten erreichen muss. Die Ärzte verabreichen daher häufig eine hohe Anfangsdosis, um diese Konzentration im Blutstrom herbeizuführen. Nach dieser Anfangsdosis werden die späte-ren Dosen zur Aufrechterhaltung dieser Konzentration ver-abreicht. Der Zeitraum zwischen den Verabreichungen hängt von der Abbaugeschwindigkeit des Arzneimittels ab.

Die ideale Formulierung für Arzneimittel mit verzögerter Abgabe sollte eine zeitlich zweiphasige Abgabe des Wirk-stoffs hervorrufen. Anfangs ist eine Phase schneller Abgabe erwünscht, damit die therapeutische Konzentration im Blut-strom hergestellt wird, und später ist eine Phase langsamerer Abgabe erforderlich, um den Wirkstoffspiegel im Blut auf-rechtzuerhalten und mit dem Abbau des Wirkstoffs durch den Körper Schritt zu halten.

Die injizierbaren Arzneimittelformulierungen gemäss Stand der Technik zeigen im allgemeinen kein derartiges, zeitlich zweiphasiges Abgabesystem. Statt dessen sind die Abgabegeschwindigkeiten derart, dass der Wirkstoff allmäh-lich und konstant während eines Zeitraums freigesetzt wird.

Das albuminhaltige Trägersystem gemäss vorliegender Erfindung beseitigt diesen Nachteil der früheren Mittel und liefert ein neuartiges System mit zeitlich zweiphasiger Wirk-stoffabgabe. Dieses System erlaubt eine einstellbare, schnelle Anfangsabgabe des Wirkstoffs, die von einer einstellbaren zweiten Phase langsamer Abgabe gefolgt ist.

Die Verwendung von Albumin als Träger oder Komplex-bildner für Medikamente ist mindestens seit 1899 bekannt. In den letzten Jahren wurden Kügelchen aus Serumalbumin als Träger für radioaktive Diagnostika und Therapeutika verwendet. Derartige Kügelchen sind in den US-PS 3 663 685, 3 663 686 und 3 663 687 beschrieben. Aus diesen Patentschriften ist es jedoch nicht bekannt, dass die Kügel-chen die neuartige Fähigkeit besitzen, darin eingeschlossene Medikamente in zeitlich zweiphasiger Weise abzugeben, nachdem man sie z. B. bei Temperaturen von 110 bis 180 °C mindestens 20 Minuten lang thermisch oder in äquivalenter Weise chemisch vernetzt hat.

Die vorliegende Erfindung stellt eine injizierbare Verab-reichungsform mit steuerbarer Arzneimittelabgabe dar, die vernetzte Serumalbumin-Kügelchen aufweist, in denen 2 bis 70 Gew.-%, bezogen auf die Kügelchen, eines nichtradioak-tiven organischen Arzneimittels, das bei 37 °C zu mindestens 0,01% wasserlöslich ist, homogen eingeschlossen sind. Das Serumalbumin der Kügelchen muss bei deren Herstellung vernetzt werden, z. B. mindestens 20 Min. auf 110 bis 180 °C erhitzt werden, oder es muss in gleichwertiger Weise mit che-mischen Vernetzungsmitteln vernetzt werden.

Wie nachstehend gezeigt wird, ist das Ausmass der Ver-netzung der Kügelchen für die Erzielung einer zeitlich zwei-phasischen Abgabe der eingeschlossenen Wirkstoffe wichtig.

Neben der erfindungsgemässen, zeitlich zweiphasigen Wirkstoffabgabe, die das Albumin-Trägersystem zeigt, sind mehrere andere Eigenschaften des Systems wichtig. Die Grösse der Kügelchen kann während der Herstellung genau eingestellt werden, und man kann diese Grösse verwenden, um die Kügelchen zu einem bestimmten Teil des Körpers zu dirigieren. So werden beispielsweise Kügelchen von 10 bis 100 Mikron Durchmesser nach intravenöser Injektion leicht in der Gefässschicht der Lunge abgelagert. Die wirkstoffhaltigen Kügelchen dieser Grösse können daher verwendet werden zur Behandlung von Lungenkrankheiten wie Asthma, Tuberkulose, Pneumonie, Tumoren u. dgl.

Kügelchen von 1 bis 5 Mikron Durchmesser können zur Abgabe von Arzneimitteln an die Leber verwendet werden. Man kann die intraarterielle Injektion oder Katheterisierung verwenden, um die Kügelchen dem Kapillarsystem anderer Organe oder Tumoren zuzuführen.

Die Lokalisierung des Wirkstoffs in den Gefässen des zu behandelnden Organs oder Tumors bietet offenkundige Vorteile. Der Wirkstoff wird direkt zur beabsichtigten Stelle gebracht, und toxische Nebeneffekte auf andere Gewebe werden vermindert. Hierdurch wird das vorliegende System besonders geeignet zur Behandlung von Tumoren mit antineoplastischen Arzneimitteln, die im allgemeinen sowohl gegenüber gesundem als auch malignem Gewebe stark toxisch sind.

Das Abgabesystem ist jedoch nicht auf die Behandlung von Tumoren oder kranken Organen beschränkt. Beispielsweise kann auch die gesunde Lunge oder Leber verwendet werden als bequem zu erreichendes Depot oder Reservoir für die Kügelchen, aus dem der Wirkstoff während eines längeren Zeitraums systemisch an den Körper abgegeben wird.

Ein besonders wichtiger Vorteil dieses Abgabesystems besteht im Ausbleiben einer Emboliebildung bei intravasculärer Verabreichung der Trägerkügelchen aus Albumin. Wasserunlösliche Arzneimittel, die bisher nicht auf diese Weise verabreicht werden konnten wegen der Gefahr von Emboliebildung, können sicher gegeben werden, wenn man sie in die Albumin-Kügelchen einschliesst.

Zu weiteren Vorteilen der Albumin-Kügelchen als Arzneimittelträger gehören die einfache Herstellbarkeit, die vollständige Beseitigung aus dem Körper durch Metabolismus, die Nicht-Antigenität, die nachweisliche Sicherheit bei intravasculärer Verabreichung, die Fähigkeit zur Anpassung an verschiedene Wirkstoffmoleküle in relativ nichtspezifischer Weise sowie weitere Vorteile, die aus der nachfolgenden Beschreibung hervorgehen.

Das im erfindungsgemässen System verwendete Trägermaterial ist Serumalbumin. Bei der Behandlung von Menschen wird normalerweise menschliches Serumalbumin verwendet, bei der Behandlung von Tieren sollte das Serumalbumin ebenfalls für die betreffende Spezies spezifisch sein, z. B. Rinderserumalbumin zur Behandlung von Rindvieh. Aus Verträglichkeitsgründen ist ein artspezifisches Serumalbumin erforderlich.

Unter der Bezeichnung «Arzneimittel» oder «Wirkstoff» werden nichtradioaktive, organische Moleküle verstanden, die in der Medizin zur Behandlung von Krankheiten oder Unregelmässigkeiten des Körpers verwendet werden.

Die Wasserlöslichkeit des Arzneimittels ist für die Ausführung der Erfindung in breiten Bereichen weitgehend unwichtig. Ist jedoch der Wirkstoff nahezu wasserunlöslich, d. h. weniger als 0,01% wasserlöslich bei 37 °C, so wird er aus den Albuminkügelchen sehr langsam freigesetzt, und die zeitlich zweiphasige Abgabe tritt weniger in Erscheinung.

Die Konzentration des Wirkstoffs im Kügelchen kann innerhalb eines breiten Bereichs variiert werden. Wirkstoffbeladungen bis zu 90% wurden mit bestimmten Arzneimit-

teln erreicht. Die typische Wirkstoffkonzentration im Kügelchen beträgt jedoch 2 bis 70 Gew.-% des Kügelchens.

Nachstehend werden Arzneimittelklassen und Beispiele spezieller Vertreter aufgeführt, die erfindungsgemäss in Serumalbumin-Kügelchen eingearbeitet wurden:

Arzneimittelklasse	Beispiele
Antiasthmatica	Intal (Dinatrium-cromoglycat)
10 Bronchienerweiterer	Epinephrin Isoproterenol Salbutamol Terbutalin Ephedrin Aminophyllin
15 Analgetika	Morphin Codein Natriumsalicylat, Salicylsäure, Meperidin-hydrochlorid («Demerol»)
20 Hustenmittel	Codein Chlophedianol-hydrochlorid
25 Narkotika	Morphin Codein Cocain Meperidin-hydrochlorid («Demerol»)
30 Mucolytika	Acetylcystein
Antibakterielle Mittel	Sulfanilamid Sulfadiazin Tetracyclin
35 Antituberkulosemittel	Rifampin («Riflamycin») Dihydrostreptomycin p-Aminosalicylsäure
Hypoglykämika	Tolbutamid («Orinase») Insulin
40 Steroide	Hydrocortison Prednison Prednisolon Prednisolon-metasulfobenzoat
45 Antitumormittel	Chlorambucil Busulfan Alkaloide Colchicin
50	Antimetaboliten 6-Mercaptopurin Thioguanin 5-Fluorouracil Hydroxyharnstoff «Adriamycin»
55 Aminosäuren	Methionin

Die Geschwindigkeit, mit der der Wirkstoff aus dem Albumin-Kügelchen abgegeben wird, hängt weitgehend vom Grad der Vernetzung des Albumins während der Herstellung ab. Wie nachstehend näher beschrieben wird, kann das Albumin entweder durch Wärmebehandlung oder durch chemische Vernetzungsmittel vernetzt werden.

65 Ausser dem Vernetzungsgrad des Albumins beeinflussen verschiedene andere Faktoren die Abgabegeschwindigkeit eines speziellen Wirkstoffs. Zu diesen Faktoren gehören das Molekulargewicht des Wirkstoffs, seine Wasserlöslichkeit

und allfällige elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Albumin.

Die Konzentration der Albuminlösung, die zur Herstellung der Kügelchen verwendet werden kann, hat ebenfalls Einfluss auf die Abgabeeigenschaften. Typischerweise werden die Kügelchen aus 20- bis 50%iger Lösung (Gewicht/Volumen) des Albumins in Wasser hergestellt. Auch aus Lösungen mit nur 2 bis 5% Proteinkonzentration oder bis zu 70 bis 80% wurden Kügelchen erzeugt. Im allgemeinen sind insbesondere bei thermisch vernetzten Kügelchen diese aus höher konzentrierten Lösungen erzeugten Kügelchen dichter, und sie geben die darin eingeschlossenen Wirkstoffe etwas langsamer ab als Kügelchen aus Lösungen niedrigerer Konzentration, wobei alle übrigen Eigenschaften gleich sind.

Im allgemeinen gibt eine gegebene Gewichtsmenge an sehr kleinen Mikrokügelchen (z. B. 1 bis 5 Mikron) mit einer gewissen Wirkstoffmenge den Wirkstoff schneller ab als die gleiche Gewichtsmenge grösserer Mikrokügelchen (z. B. 50 bis 100 Mikron), die die gleiche Wirkstoffmenge enthalten, und zwar wegen der grösseren Oberfläche der kleineren Kügelchen. Während alle anderen Eigenschaften gleich bleiben, geben daher kleinere Mikrokügelchen den Wirkstoff im allgemeinen schneller ab als grössere Mikrokügelchen, wobei die Überlegungen auf der Grösse der Oberfläche basieren. Zusammen mit anderen der obigen Parameter kann daher eine Veränderung der Kugelgrösse verwendet werden, um die Wirkstoffabgabegeschwindigkeit einzuregulieren.

Während die genannten Faktoren die Abgabegeschwindigkeit einzelner Wirkstoffe aus Albumin-Mikrokügelchen beeinflussen, bedingen die Eigenschaften des im angegebenen Ausmass vernetzten Albumins, dass der Wirkstoff in überraschender Weise zeitlich in zwei Phasen abgegeben wird.

Das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäss verwendeten Kügelchen ist im wesentlichen in der US-PS 3 663 687 beschrieben, wobei jedoch verschiedene Verbesserungen dieses Verfahrens aufgefunden wurden.

Nach diesem Verfahren kann der Wirkstoff direkt in einer wässrigen Lösung des Serumalbumins in der gewünschten Konzentration gelöst oder dispergiert werden. Die Albuminkonzentration beträgt im allgemeinen 20 bis 60% (Gewicht/Volumen). Die Wirkstoffkonzentration in der Serumalbuminlösung liegt typischerweise bei 5 bis 30 Gew.-% des Serumalbumins. Um eine gleichmässige und homogene Verteilung stark wasserunlöslicher Wirkstoffe in der Serumalbuminlösung sicherzustellen, sollte der Wirkstoff vor der Dispergierung in der Kugelmühle behandelt oder mikronisiert worden sein.

Nach der Zugabe des Wirkstoffs zur Serumalbuminlösung wird das Gemisch zweckmässig 50 bis 60 Min. zur Gleichgewichtsbildung stehengelassen. Während dieser Stufe kann ein gewisser Anteil der Wirkstoffmoleküle an Serumalbuminmoleküle gebunden werden. Die jeweilige Menge hängt von Faktoren wie der Art der Bindungsstellen am Serumalbumin, der Menge und Polarität allfälliger elektrostatischer Ladungen an Träger und Wirkstoff, der Konzentration von Wirkstoff und Träger in der Lösung, der Gleichgewichtskonstanten zwischen Träger-Bindungsstellen und Wirkstoffmolekülen, der Temperatur und anderen Faktoren des Massengesetzes ab.

Bei der praktischen Ausführung zur Herstellung von Kügelchen durch Einschluss wird z. B. die wässrige Serumalbuminlösung, die den Wirkstoff gelöst oder dispergiert enthält, durch eine hypodermische Nadel von 5,1 oder 6,4 μ in ein Bad aus Pflanzenöl injiziert, das schnell mit 500 bis 2500 Umdrehungen/Minute gerührt wird. Unter fortgesetztem Rühren wird das Bad typischerweise im Verlauf von 15 bis 30 Min. auf eine Temperatur von 110 bis 180 °C erhitzt

und dann mindestens 20 Min. bei dieser Temperatur gehalten. Wärmebehandlungen von mehr als 10 Std. sind im allgemeinen nicht erforderlich. Während dieses Erhitzens, das zu einer inneren Vernetzung und schliesslich zur Unlöslichkeit der Trägerkügelchen führt, wird derjenige Teil des unlöslichen Wirkstoffs oder überschüssiger löslicher Wirkstoff, der nicht chemisch an geeignete Stellen des Proteinträgers gebunden ist, in den Zwischenräumen zwischen Trägerketten eingefangen, die die dreidimensionale Kugelform bilden.

Dieses Verfahren mit Rühren und Erwärmen liefert unter den angegebenen Bedingungen wasserunlösliche Kügelchen von 5 bis 80 Mikron Durchmesser. Der Teilchengrößenbereich der Kügelchen kann gesteuert werden, indem man die Injektionsgeschwindigkeit der Wirkstoff/Trägerlösung oder -dispersion in das Ölbad ändert und/oder indem man die Rührgeschwindigkeit verändert. Auch durch den Zusatz kleiner Mengen (0,1 bis 2%) von Tensiden (z. B. Tween 80, Pluronic F-68) zur Ausgangs-Serumalbuminlösung kann die endgültige Teilchengrösse über den indirekten Einfluss auf Oberflächen- und Grenzflächenspannungen beeinflusst werden. Die biologische Abbaubarkeit und Porosität der Kügelchen kann gesteuert werden, indem man Dauer und Temperatur des Erwärmungsvorgangs verändert. Wenn die anderen Parameter gleich bleiben, so führen höhere Temperaturen und längere Erhitzungszeiten im allgemeinen zu härteren, weniger porösen und langsamer abbauenden Kügelchen. Sobald der gewünschte Grad an Unlöslichkeit der Kügelchen erreicht ist, kann das Ölbad entweder in Luft oder Eiswasser abgekühlt und die Kügelchen durch Ultrafiltration oder Absaugen mit einem Milliporenfilter von 0,45 Mikron Porengrösse oder Filterpapier Whatman Nr. 5 aus dem Öl entfernt werden. Durch mehrmaliges Waschen der Kügelchen mit Heptan und/oder Äther kann restliches Öl von der Oberfläche der Kügelchen beseitigt werden. Nach dem Trocknen an der Luft werden die wirkstoffhaltigen Kügelchen in der Regel als freifliessendes Pulver erhalten, dessen Färbung von der Färbung der einverleibten Wirkstoffe abhängt. Zur intravaskulären Injektion können die Kügelchen in einem pharmazeutisch zulässigen und zu dieser Verabreichungsart geeigneten Medium suspendiert werden.

Das Unlöslichmachen durch Wärmeeinwirkung ist besonders vorteilhaft, da man auf diese Weise sowohl Dispersionen wasserunlöslicher Wirkstoffe als auch Lösungen wasserlöslicher Wirkstoffe durch Einfangen in die Kügelchen einschliessen kann. Trotz der zahlreichen Vorteile besitzt diese Methode jedoch einen Nachteil, der sich auf die Tatsache bezieht, dass man während der Bildung der Kügelchen und dem Einschliessen des Wirkstoffs häufig auf Temperaturen von mehr als 110 °C erhitzen muss. Diese hohen Temperaturen sind für hitzebeständige Wirkstoffe ohne Bedeutung, sie können jedoch bei weniger beständigen Wirkstoffen zu einem Abbau und Wirkungsverlust führen. Um dieser Schwierigkeit zu begegnen, wurden Verfahren zum Unlöslichmachen bei Raumtemperatur entwickelt.

Diese Verfahren verwenden chemische Vernetzungsmittel, insbesondere Formaldehyd und Glutaraldehyd, die ausgezeichnete Härter für Serumalbumin darstellen.

Es wurde gefunden, dass lipophile trocknende Alkohole wie n-Butanol, sek.-Butanol oder 1-Äthylhexanol leicht in Pflanzenölen wie Baumwollsaamenöl, einem Standardmedium zur Bildung der Kügelchen, gelöst werden können. Wasserlösliche Vernetzungsmittel wie Formaldehyd und Glutaraldehyd können in den trocknenden Alkoholen gelöst werden. Insbesondere bis zu 25 Volumenprozent der wasserlöslichen Vernetzungsmittel Glutaraldehyd (in Form einer 25%igen wässrigen Lösung) oder Formaldehyd (in Form einer 37%igen wässrigen Lösung) können in einem lipophilen trocknenden Alkohol wie n-Butanol gelöst werden. Werden

etwa 1 bis 40 Volumenteile einer derartigen Glutaraldehyd-butanol- oder Formaldehyd/Butanol-Lösung mit 70 bis 500 Teilen Baumwollsaamenöl vermischt, so erhält man eine Bad-lösung, die sowohl gelöstes Vernetzungsmittel als auch trocknenden Alkohol enthält. Wird nun eine 25- bis 50%ige wässrige Serumalbuminlösung in dieses Bad unter Rühren mit etwa 1200 bis 1500 Umdrehungen/Minute injiziert, so erhält man Kügelchen von 20 bis 100 Mikron Grösse (kleinere Kügelchen können mit höheren Rührgeschwindigkeiten oder mit niedrigerer Trägerkonzentration in der in das Bad injizierten Ausgangslösung erzielt werden). Das Lösungsmittel Wasser in den Kügelchen wandert in den trocknenden Alkohol, während die Kügelchen durch den Glutaraldehyd oder Formaldehyd vernetzt werden. Die Kügelchen werden z. B. nach mindestens 20 Min. Kontaktzeit mit dem vernetzenden Medium aus dem Bad abfiltriert. Die Abgabeesenschaften derartiger Kügelchen sind ähnlich wie bei den durch thermisches Vernetzen hergestellten Kügelchen. Der Vernetzungsgrad kann gesteuert werden durch Verändern der Kontaktzeit mit dem Vernetzungsmittel und der Menge des Vernetzungsmittels.

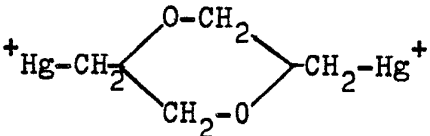
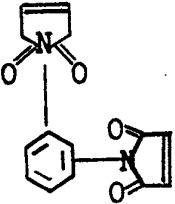
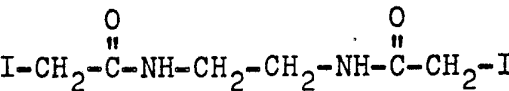
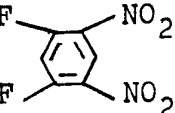
Das obige Verfahren ist dadurch besonders vorteilhaft, dass die Bildung der Trägerkügelchen, Entwässerung und Vernetzung in einer einzigen Stufe stattfinden. Wird das Vernetzungsmittel weggelassen, so erhält man chemisch entwässerte, trockene, freifliessende Albumin-Mikrokügelchen, die sich beim Kontakt mit Wasser lösen.

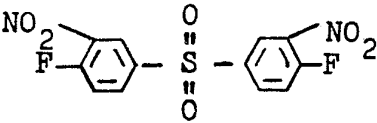
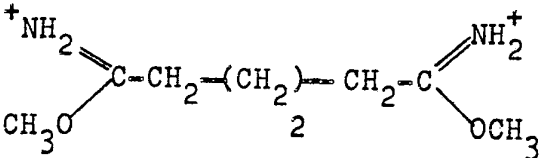
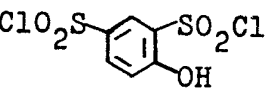
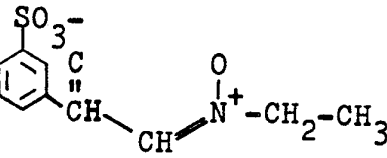
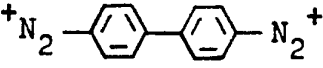
Die Methode bei Raumtemperatur eignet sich insbesondere zum Einschliessen hitzeempfindlicher wasserlöslicher und wasserunlöslicher Wirkstoffe, obgleich sie auch bei thermisch beständigen Wirkstoffen angewandt werden kann. Eine Abwandlung dieser Technik kann auch bei Wirkstoffen angewandt werden, die ohne Gefahr auf Temperaturen bis zu 105 °C erhitzt werden können.

Bei diesen abgewandelten chemischen Vernetzungsverfahren wird das Albumin/Wirkstoffgemisch in ein Bad von niedriger Temperatur (weniger als 105 °C) injiziert, und die Kügelchen werden teilweise unlöslich. Ferner kann man das Albumin/Wirkstoffgemisch zu Kügelchen formen und ohne Vernetzung chemisch entwässern. Die resultierenden Kügelchen werden isoliert und in einem Exsikkator mindestens 20 Min. lang Glutaraldehyd- oder Formaldehyd-Dämpfen ausgesetzt. Der Formaldehyd und/oder Glutaraldehyd kann am Boden des Exsikkators in Form einer handelsüblichen 37%igen bzw. 25%igen wässrigen Lösung angeordnet sein. Die Behandlung mit Aldehyddämpfen kann mehrere Tage lang ausgeführt werden, wobei fortgesetzte Behandlung zu dichteren, weniger porösen und stärker unlöslichen Kügelchen führt. Nach der Vernetzung mit dem Dampf wird überschüssiger Formaldehyd oder Glutaraldehyd direkt durch Absaugen oder Vakuumtrocknung von den so behandelten Mikrokügelchen entfernt.

Ausser den bevorzugten Vernetzungsmitteln Formaldehyd und Glutaraldehyd können auch andere Vernetzungsmittel zur Herstellung der erfindungsgemässen Serumalbuminkügelchen verwendet werden. Beispielsweise kann man zwei-, drei- und vierwertige Metallkationen verwenden. Kationen wie Fe^{3+} , Al^{3+} u. dgl. können leicht in n-Butanol, sek.-Butanol, 2-Äthylhexanol oder anderen lipophilen trocknenden Alkoholen gelöst werden, die man ihrerseits in Baumwollsaamenöl oder anderen Pflanzenölen lösen kann. Die resultierende Lösung kann als einstufiges Vernetzungsbad für die Serumalbumin-Trägerkügelchen dienen.

Andere Protein-Vernetzer sind bekannt und können als Alternativen eingesetzt werden. Einige dieser Vernetzungsmittel sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Vernetzungsmittel	Löslichkeit	reagiert bevorzugt mit folgenden Gruppen im Protein
3,6-Bis(mercurimethyl)-dioxan	löslich	Sulfhydryl
		
N,N'-(1,3-Phenyl)-bis-maleimid	unlöslich	Sulfhydryl
		
N,N'-Äthylen-bis-(iodacetamid)	löslich	Sulfhydryl
		
1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol	unlöslich	Aminogruppen-, Tyrosin
		

Vernetzungsmittel	Löslichkeit	reagiert bevorzugt mit folgenden Gruppen im Protein
p,p'-Difluor-m,m'-dinitrodiphenylsulfon 	unlöslich	Aminogruppen, Phenolgruppen
Dimethyl-adipimidat 	löslich	Aminogruppen
Phenol-2,4-disulfonylchlorid 	löslich	Aminogruppen
Hexamethylendiisocyanat $\text{O}=\text{C}=\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{O}$	unlöslich	Aminogruppen
Woodward's Reagenz K 	löslich	Verknüpft Carboxyl- und Aminogruppen
Bis-diazobenzidin 	löslich	Tyrosin, Histidin

Die obigen wasserunlöslichen Reagenzien können direkt unter Rühren im hydrophoben Ölbad gelöst werden und in dieser Form zum Vernetzen der Serumalbuminkügelchen dienen, die durch Injektion einer wässrigen Lösung des Serumalbumins in das Bad entstehen. Wasserlösliche Vernetzungsmittel können direkt der wässrigen Serumalbuminlösung zugegeben werden oder im Alkohol gelöst werden, der in Öl als Entwässerungsmittel wirkt.

Selbstverständlich können auch Kombinationen aus thermischer und chemischer Vernetzung angewandt werden, um den Serumalbuminkügelchen die erwünschten Abgabeeigenschaften zu verleihen.

Beispiel 1

Dieses Beispiel illustriert typische Herstellweisen wirkstoffhaltiger Serumalbumin-Mikrokügelchen unter Verwendung thermischer und chemischer Vernetzung.

Probe A: thermische Vernetzung

0,9999 g menschliches Serumalbumin (Sigma, Fraktion V, Probe Nr. 246-16318) werden in 2.0 ml entionisiertem Wasser unter Rühren mit einem Magnetrührer gelöst. Zum gelösten Albumin werden 0,1057 g des Antitumormittels 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma, Probe Nr. 23C-2850) zugegeben, dann wird noch 15 Min. gerührt. Da sich das 5-Fluorouracil in der Albuminlösung nicht vollständig löst, wird das wässrige Gemisch in einen Standard-Gewebezerkleinerer von 10 ml Fassungsvermögen (Ace Glass Co.) gegeben

und dort dispergiert, um eine homogene Verteilung der ungelösten Fluorouracil-Teilchen in der Albuminlösung sicherzustellen.

Das Gemisch wird dann mit einer Tuberkulinspritze, die mit einer hypodermischen Nadel von 5,1 μ ausgestattet ist, in 500 ml Baumwollsaamenöl (das sich in einem nichtrostenden Stahlbecher von 600 ml Fassungsvermögen befindet) bei Raumtemperatur injiziert, wobei mit einem 3,8-cm-Propeller-Rührer mit etwa 2300 Umdrehungen/Minute gerührt wird. Die Rührgeschwindigkeit wird mit einem Cole-Parmer-Tachometer gemessen, da die Rührgeschwindigkeit die endgültige Teilchengrößenverteilung in hohem Ausmass bestimmt. Es wird weitergerührt, während das Ölbad mit einem 500-Watt-Tauchsieder im Verlauf von 15 Min. auf 140 °C erhitzt wird. Das Bad wird 1 Std. unter Rühren mit 2300 Umdrehungen/Minute auf dieser Temperatur gehalten.

Danach werden Ölbad und sein Inhalt auf Raumtemperatur abgekühlt, und die Mikrokügelchen werden unter Verwendung von Filterpapier Whatman Nr. 5 durch Absaugen vom Öl getrennt. Letzte Ölsuren werden durch mehrmaliges Waschen mit jeweils 300 ml Heptan entfernt.

Das obige Verfahren erzeugt Mikrokügelchen aus menschlichem Serumalbumin, die das Antitumormittel 5-Fluorouracil in einer Konzentration von 9,6 Gew.-% enthalten. Die Kügelchen liegen als nichtagglomeriertes, freifliessendes, hellbraunes Pulver vor, wobei die einzelnen Kügelchen zwischen 10 und 16 Mikron Grösse haben.

Probe B: chemische Vernetzung

0,9990 g menschliches Serumalbumin (Sigma Chemical Company) werden unter Rühren mit einem Magnetrührer in 2,0 ml entionisiertem Wasser gelöst. Zum gelösten Albumin werden 0,1500 g L-Epinephrin (freie Base, Sigma) und 0,0725 g L(+)-Ascorbinsäure (Sigma) zugegeben, und es wird noch weitere 15 Min. gerührt.

Das Gemisch wird dann sofort mit einer Tuberkulinspritze, die mit einer hypodermischen Nadel von 5,1 µ ausgestattet ist, in ein Bad zur Kugelbildung injiziert, das aus 500 ml Baumwollsaamenöl, 13 ml n-Butanol und 2,0 ml 25% Glutaraldehyd besteht. Das Bad befindet sich in einem 600-ml-Becher aus nichtrostendem Stahl und wird bei Raumtemperatur mit einem 3,8-cm-Propeller-Rührer mit etwa 1200 Umdrehungen/Minute gerührt. Die Rührgeschwindigkeit wird mit einem Cole-Parmer-Tachometer verfolgt. Es wird noch 4 Std. gerührt, wobei während dieser Zeit die beim Einspritzen der Albumin-Epinephrin/Ascorbinsäure-Lösung entstandenen Mikrokügelchen durch das n-Butanol entwässert und durch den Glutaraldehyd vernetzt werden.

Nach diesem Zeitraum werden die resultierenden Kügelchen abgesaugt unter Verwendung von Filterpapier Whatman Nr. 5. Letzte Ölsuren werden durch dreimaliges Waschen mit jeweils 100 ml Heptan von den Kügelchen entfernt.

Das obige Verfahren erzeugt wirkstoffhaltige Mikrokügelchen aus menschlichem Serumalbumin mit folgender Trockengewicht-Zusammensetzung: Serumalbumin 81,8%, 1-Epinephrin 12,3%, L(+)-Ascorbinsäure 5,9%. Die Kügelchen liegen als freifliessendes, nichtagglomeriertes, gelboranges Pulver vor, Grösse der einzelnen Kügelchen zwischen 10 und 80 Mikron.

Beispiel 2

In diesem und den folgenden Beispielen wird die Wirkstoffabgabe wirkstoffhaltiger Albuminkügelchen in vitro in dynamischer Weise nach einem Fliesszellverfahren untersucht. Die Fliesszelle besteht aus einem zylindrischen Rohr von 1,27 × 5,1 cm, das an jedem Ende mit einer Sinterglasfritte Corning Typ D von 10 bis 20 Mikron Porengrösse ausgestattet ist. Eine Klammer und O-Ringdichtung erlauben die einfache Beschickung der Zelle mit den Mikrokügelchen und einfachen Abbau zum Reinigen. Bei einem typischen Versuch werden etwa 10 mg der wirkstoffhaltigen Kügelchen in einen Teil der auseinandergenommenen Zelle gebracht, die dann zusammengesetzt wird. Ein Ende der Zelle wird mit einem Teflonrohr (Aussendurchmesser 3,2 mm, Innendurchmesser 2,16 mm) an eine Messpumpe ISCO Modell 310 angeschlossen, die Phosphat-gepufferte Salzlösung vom pH 7,4 (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 8 mM NaHPO₄, 1 mM KH₂PO₄) mit einer vorbestimmten konstanten Pumpgeschwindigkeit, im allgemeinen 30 ml pro Stunde, durch die Zelle pumpt. Die wirkstoffhaltige, aus der Zelle austretende Lösung gelangt durch eine Cuvette, die sich in einer optischen Einheit für ultraviolette (oder je nach den spektrophotometrischen Absorptionseigenschaften des Wirkstoffs auch sichtbares) Licht befindet und an einen ISCO UA-2-Analysator angeschlossen ist. Dieses Instrument liefert eine Linienschreiber-Aufzeichnung der aus den Kügelchen abgegebenen Wirkstoffkonzentration (als optische Dichte) gegen die Zeit. Die Fliesszelle wird stetig in einem Wasserbad von 37 °C eingetaucht gehalten.

Das gesamte bei diesem Versuch austretende Material wird in einem gradierten Zylinder gesammelt. Die spektrophotometrische Analyse mit einem Spektrophotometer Beckman DK-2A erlaubt nach dem Beerschen Gesetz die Bestimmung der gesamten prozentualen Wirkstoffmenge,

die während der Versuchsdauer aus den Mikrokügelchen freigesetzt wurde. Ausschneiden und Wiegen der Fläche unterhalb der Kurve des Linienschreibers erlaubt die Bestimmung der aus den Mikrokügelchen freigesetzten Wirkstoffmenge in Prozent als Funktion der Zeit.

Dieses Beispiel illustriert, wie man verschiedene thermische oder chemische Vernetzungsverfahren verwenden kann, um die Abgabemenge des Bronchienerweiterers Epinephrin aus Albumin-Mikrokügelchen einzuregulieren. Die Abgabemenge wurde nach der vorstehend beschriebenen Methode bestimmt.

Probe A

Ausgangs-Albuminkonzentration in Wasser: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 3,1% L(+)-Ascorbinsäure, 88,1% menschliches Serumalbumin, 8,8% Epinephrin (freie Base).

Vernetzungsbedingungen: 115 °C in Baumwollsaamenölbad während 1 Stunde.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
25 3	4,3	95,7
6	11,0	89,0
9	23,4	76,6
12	34,6	65,4
15	38,1	61,9
15 18	51,5	48,5
21	56,7	43,3
24	60,8	39,2
27	65,5	34,5
30	68,6	31,4
35 36	74,5	25,5
42	78,5	21,5
48	81,4	18,6
63	87,4	13,6
78	89,3	10,7
40 208	94,7	5,3

Probe B

Ausgangs-Albuminkonzentration: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 87,5% menschliches Serumalbumin, 8,9% Epinephrin, 3,6% L(+)-Ascorbinsäure.

Vernetzungsbedingungen: 120 °C in Baumwollsaamenölbad während 6 Stunden.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
55 3	7,5	92,5
6	17,1	82,9
9	25,5	74,5
12	34,3	65,7
15	41,3	58,7
60 18	47,4	52,6
21	52,2	47,8
27	59,1	40,9
33	64,2	35,8
42	69,2	30,8
65 57	73,6	26,4
72	76,0	24,0
102	78,9	21,1
154	81,6	18,4

Probe C

Ausgangs-Albuminkonzentration: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 86,9% menschliches Serumalbumin, 8,7% Epinephrin, 4,4% L(+)-Ascorbinsäure.

Vernetzungsbedingungen: 130 °C in Baumwollsaamenölbad während 6 Stunden.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
3	7,8	92,2
6	18,0	82,0
9	26,2	73,8
12	33,2	66,8
15	38,4	61,6
18	42,1	57,9
21	45,8	54,2
27	51,2	48,8
33	56,2	43,8
48	63,5	36,5
66	70,8	29,2

Probe D

Ausgangs-Albuminkonzentration: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 87,5% menschliches Serumalbumin, 8,8% Epinephrin, 3,7% L(+)-Ascorbinsäure.

Vernetzungsbedingungen: 145 °C in Baumwollsaamenölbad während 6 Stunden.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
4	2,4	97,6
7	6,1	93,9
10	10,2	89,8
13	13,9	86,1
16	16,4	83,6
22	20,8	79,2
34	25,0	75,0
44	30,7	69,3

Probe E

Ausgangs-Albuminkonzentration: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 87,8% menschliches Serumalbumin, 8,9% Epinephrin, 3,3% L(+)-Ascorbinsäure.

Vernetzungsbedingungen: 165 °C in Baumwollsaamenölbad während 6 Stunden.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
3	1,0	99,0
6	2,3	97,7
9	4,0	96,0
12	5,2	94,8
15	6,3	93,7
18	7,6	92,4
21	8,2	91,8
27	9,5	90,5

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
48	12,4	87,6
78	14,8	82,3
158	17,7	82,3

Probe F

Ausgangs-Albuminkonzentration: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 81,8% menschliches Serumalbumin, 12,3% Epinephrin, 5,9% L(+)-Ascorbinsäure.

Vernetzungsbedingungen: 4 Std. in 500 ml Baumwollsaamenöl, das 13 ml n-Butanol und 2,0 ml 25% Glutaraldehyd enthält.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
5	2,6	97,4
8	6,5	93,5
11	11,2	88,8
14	13,6	86,4
17	16,0	84,0
20	18,0	82,0
23	19,3	80,7
26	21,0	79,0
30	26,7	73,3
34	29,3	70,7
44	30,1	69,9
74	32,8	67,2

Wie aus den Versuchen A bis E ersichtlich, wird durch steigende Reaktionszeit und -temperatur sowohl die Geschwindigkeit, mit der das Epinephrin aus den Albuminkügelchen freigesetzt wird, als auch die Gesamtmenge an freigesetztem Wirkstoff durch einfache Diffusion herabgesetzt. Der Rest des in den Kügelchen eingeschlossenen Wirkstoffs würde vermutlich beim Abbau der Kügelchen im Körper freigesetzt. Probe A (115 °C, 1 Std.) gibt beispielsweise nahezu 50% des eingeschlossenen Wirkstoffs innerhalb einer Stunde ab, während die stärker vernetzte Probe E (165 °C, 6 Std.) innerhalb 3 Std. weniger als 20% des eingeschlossenen Wirkstoffs abgibt. Diese Proben illustrieren somit, wie die Wahl von Dauer und Temperatur der Vernetzung zu Kügelchen führt, die den Wirkstoff in vorbestimmter Geschwindigkeit und Menge freigeben.

Es sei auch beachtet, dass im Versuch F die 4stündige Vernetzung mit Glutaraldehyd etwa einer 6stündigen Behandlung bei 140 bis 150 °C gleichkommt.

Die Abgabewerte der Versuche A bis F wurden mathematisch analysiert, um die Geschwindigkeitskonstante für die Wirkstoffabgabe (K) und die Halbwertszeit (t_{1/2}) der Wirkstoffabgabe zu bestimmen.

Wird angenommen, dass die Geschwindigkeit der Wirkstoffabgabe aus den Kügelchen erster Ordnung ist und damit proportional der Konzentration des in den Kügelchen zurückbleibenden Wirkstoffs, so lässt sich die Geschwindigkeitskonstante ermitteln nach der Gleichung

$$\frac{-dc}{-dt} = Kc$$

worin c die Konzentration des in den Kügelchen zurückbleibenden Wirkstoffs bei der Zeit t, K die Geschwindigkeitskonstante der Wirkstoffabgabe, t die Zeit und c₀ die Anfangskonzentration des Wirkstoffs bei t = 0 bedeuten.

Aus dieser Gleichung wird die Endgleichung zur Bestimmung der Abgabekonzstante (K) erster Ordnung wie folgt abgeleitet:

$$(1) \quad \frac{-dc}{c} = Kdt$$

$$(2) \quad \int_{c_0}^c \frac{dc}{c} = \int_0^t Kdt$$

$$(3) \quad \ln c - \ln c_0 = -Kt$$

$$(4) \quad \ln(c/c_0) = -Kt \\ \text{oder} \\ c = c_0 e^{-Kt}$$

Beide Seiten der Gleichung werden mit 100 multipliziert, um den Anteil des zurückbleibenden Wirkstoffs (c/c_0) in Prozent zurückbleibenden Wirkstoff ($100c/c_0$) umzurechnen.

$$(5) \quad \frac{100c}{c_0} = 100e^{-Kt}$$

Wenn man den natürlichen Logarithmus von beiden Seiten der Gleichung nimmt:

$$(6) \quad \ln(100c/c_0) = \ln \\ (\% \text{ Wirkstoff, die in den Kügelchen bleiben}) \\ = -Kt + \ln 100 = -Kt + B \text{ (a konstant)}$$

$$(7) \quad \ln(100c/c_0) = -Kt + B$$

Würde ein Abgabeverhalten erster Ordnung durch das Wirkstoff/Kügelchen-System befolgt, so wäre eine Aufzeichnung von $\ln(c/c_0)$ oder $\ln(100c/c_0)$ gegen die Zeit linear mit der Neigung $-K$.

$$^5 \text{ Bei } c = 0,5 c_0 \\ \ln(c/c_0) = \ln(0,5c/c_0) = 0,5 = -Kt_{1/2},$$

$$\text{wobei } t_{1/2} \times \text{Halbwertszeit der Abgabe} = \frac{-\ln 0,5}{K} = \frac{0,693}{K}$$

¹⁰ Es ist somit möglich, sowohl die Geschwindigkeitskonstante der Abgabe K als auch $t_{1/2}$ aus entsprechenden Aufzeichnungen von $\ln(c/c_0)$ gegen die Zeit zu bestimmen.

Zeichnet man die Abgabewerte der Versuche A bis F auf, ¹⁵ so wurde gefunden, dass die ersten 30 bis 50 Minuten jeder Abgabekurve nahezu linear sind und durch die Gleichung $\ln(c/c_0) = -Kt$ (Anteil des durch die Kügelchen zurückgehaltenen Wirkstoffs) oder $\ln(100c/c_0) = -Kt + B$ (in Prozent des durch die Kügelchen zurückgehaltenen Wirkstoffs) wiedergegeben werden können.

²⁰ Stehen ausreichende Werte zur Verfügung, so kann der hintere Teil der Abgabekurven durch eine weitere gerade Linie anderer Steigung wiedergegeben werden. Die Kurven $\ln(c/c_0)$ oder $\ln(100c/c_0)$ gegen die Zeit krümmen sich im ²⁵ mittleren Teil, was eine Veränderung der Abgabeeigenschaften von schneller zu langsamer Abgabe mit fortschreitender Abgabe anzeigt.

Die Abgabewerte der Versuche A bis F wurden gemäss Gleichung (7) analysiert unter Verwendung der Fehlerquadratmethode und die «am besten passenden» geraden Linien ³⁰ durch Anfangs- und Endteil der Kurven wurden bestimmt. Auch die Werte K und $t_{1/2}$ wurden für Anfangs- und Endstück jeder Abgabekurve bestimmt. Die am besten passenden B-Parameter, K- und $t_{1/2}$ -Werte sind in folgender Tabelle ³⁵ zusammengefasst:

Probe	K(Beginn)	$t_{1/2}$ (Beginn)	B(Beginn)	K(Ende)	$t_{1/2}$ (Ende)	B(Ende)
A	$37,94 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	18,3 min	4,63	$6,07 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	114,2 min	2,92
B	$32,67 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	21,2 min	4,59	$3,18 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	217,9 min	3,39
C	$25,37 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	27,3 min	4,55	keine ausreichenden Werte	–	–
D	$9,09 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	76,2	4,60	keine ausreichenden Werte	–	–
E	$3,92 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	176,7 min	4,60	$0,55 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	1271,6 min	4,49
F	$9,70 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	71,4 min	4,61	$0,41 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	1686,1 min	4,28

Beispiel 3

Serumalbumin-Kügelchen mit dem Antitumormittel 5-Fluorouracil wurden hergestellt und die Abgabe des Wirkstoffs wurde nach der Methode von Beispiel 2 ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die folgenden Tabellen.

Probe A

Ausgangs-Albuminkonzentration: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 90,9% menschliches Serumalbumin, 9,1% 5-Fluorouracil.

Vernetzungsbedingungen: 1 Std. in Baumwollsaamenöl bei 100  C.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
1	4,4	95,6
4	23,2	76,8
7	42,7	57,3
10	54,7	45,3
13	63,4	36,6

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
16	70,1	29,9
19	75,9	24,1
25	83,4	16,6
31	88,3	11,7

Probe B

⁵⁵ Ausgangs-Albuminkonzentration: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 90,4% menschliches Serumalbumin, 9,6% 5-Fluorouracil.

⁶⁰ Vernetzungsbedingungen: 1 Std. in Baumwollsaamenöl bei 140  C.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
2	2,3	97,7
5	9,0	91,0
8	15,5	84,5

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
11	20,0	80,0
14	22,5	77,5
17	24,2	75,8
20	25,5	74,5
100	31,4	68,6

Beispiel 4

Dieses Beispiel illustriert die Abgabe des Antitumorwirkstoffs 6-Merkaptopurin aus Kügelchen aus menschlichem Serumalbumin, ermittelt nach der Methode von Beispiel 2.

Ausgangs-Albuminkonzentration: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 83,4% menschliches Serumalbumin, 16,6% 6-Merkaptopurin.

Vernetzungsbedingungen: 1 Std. in Baumwollsaamenöl bei 140 °C.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
4	2,1	97,9
7	5,8	94,2
10	9,6	90,4
13	12,3	87,7
16	14,8	85,2
19	16,7	83,3
25	20,3	79,7
40	26,6	73,4
55	31,4	68,6
70	34,8	65,2
100	39,5	60,5
130	41,6	58,4
148	44,4	55,6

Beispiel 5

Dieses Beispiel illustriert die Abgabeeigenschaften des Antitumormittels 6-Thioguanin aus Kügelchen aus menschlichem Serumalbumin, ermittelt nach der Methode von Beispiel 2.

Ausgangs-Albuminkonzentration: 50% (Gewicht/Volumen).

Zusammensetzung der Kügelchen: 82,2% menschliches Serumalbumin, 17,8% 6-Thioguanin.

Vernetzungsbedingungen: 1 Std. in Baumwollsaamenöl bei 123 °C.

Zeit (Minuten)	Abgabeeigenschaften % Wirkstoff freigesetzt	% Wirkstoff zurückgehalten
0	0	100
7	1,2	98,8
10	2,3	97,7
13	3,3	96,7
16	4,6	95,4
19	6,5	93,5
22	7,7	92,3
25	9,1	90,9
28	10,4	89,6
34	13,0	87,0
40	15,2	84,8
55	20,3	79,7
85	29,7	70,3
115	37,7	62,3
145	43,0	57,0
175	47,9	52,1
412	55,0	45,0

Beispiel 6

Antitumormittel

Eine Analyse der Abgabewerte der Beispiele 3 bis 5 wurde nach dem Verfahren von Beispiel 2 durchgeführt. Die Geschwindigkeitsparameter zeigen die folgende Tabelle:

Beispiel	K(Beginn)	t1/2(Beginn)	B(Beginn)	K(Ende)	t1/2(Ende)	B(Ende)
3A (100 °C, 1 Std.)	$76,64 \times 10^{-3} \text{Min.}^{-1}$	9,0 Min.	4,61	$60,17 \times 10^{-3} \text{Min.}^{-1}$	11,5 Min.	4,32
3B (140 °C, 1 Std.)	$19,51 \times 10^{-3} \text{Min.}^{-1}$	35,5 Min.	4,61	$1,13 \times 10^{-3} \text{Min.}^{-1}$	615 Min.	4,34
4 (140 °C, 1 Std.)	$9,66 \times 10^{-3} \text{Min.}^{-1}$	71,1 Min.	4,61	$2,13 \times 10^{-3} \text{Min.}^{-1}$	325 Min.	4,33
5 (123 °C, 1 Std.)	$4,27 \times 10^{-3} \text{Min.}^{-1}$	162,3 Min.	4,62	$0,78 \times 10^{-3} \text{Min.}^{-1}$	886 Min.	4,13

Vergleicht man die K- und t1/2-Werte der Beispiele 3A und 3B, so sieht man, dass die das 5-Fluorouracil enthaltenden und eine Stunde auf 100 °C erhitzten Albuminkügelchen sehr schwachen zweiphasigen Charakter zeigen, während die bei 140 °C 1 Std. lang vernetzten Kügelchen stark zweiphasig sind. Die t1/2 (Beginn)- und t1/2(Ende)-Werte steigen stark bei erhöhter Vernetzungstemperatur.

Sowohl 6-Merkaptopurin als auch 6-Thioguanin, in Albumin-Kügelchen eingefangen, zeigen zweiphasige Abgabeeigenschaft, wie aus den Beispielen 4 und 5 ersichtlich. Die t1/2(Beginn)- und t1/2(Ende)-Werte sind beim 6-Merkaptopurin höher als beim 6-Thioguanin, obgleich das 6-Merkaptopurin auf 140 °C erhitzt worden war, gegenüber den 123 °C beim 6-Thioguanin. Die grösseren t1/2-Werte beim 6-Thioguanin reflektieren dessen geringere Wasserlöslichkeit, verglichen mit dem 6-Merkaptopurin.

Die folgenden Beispiele illustrieren, dass durch die Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemässen Kügelchen die Aktivität des eingefangenen Wirkstoffs nicht zerstört wird.

Beispiel 7

Etwa 20 bis 25 mg Kügelchen aus menschlichem Serumalbumin, hergestellt aus 50%igen Albuminlösungen, die den Bronchienerweiterer Epinephrin enthalten, werden in 10 ml einer wässrigen Salzsäurelösung (pH 3,0) dispergiert und 1 Std. lang magnetisch gerührt, um nachweisbare Mengen des eingefangenen Wirkstoffs freizusetzen. Die Kügelchen werden zentrifugiert und von der überstehenden Flüssigkeit abgetrennt, die spektrophotometrisch analysiert wird zur Bestimmung der Konzentration des freigesetzten Wirkstoffs. Die überstehenden Proben wurden dann in vitro auf ihre Wirkung getestet unter Verwendung des folgenden Tests mit Trachealgewebe von Meerschweinchen.

Trachealgewebe von Meerschweinchen wird in Krebslösung von 38 °C suspendiert und ins Gleichgewicht kommen gelassen. Das Gewebe wird mit einem Spannungsmesser und Leistungsschreiber in der Art verbunden, dass die auf die Kontraktion oder Entspannung zurückgehende Länge des Gewebes gemessen werden kann. Durch kleine Mengen Agonisten wie Histamin (etwa 2 Mikrogramm pro Milliliter)

wird eine starke Gewebekontraktion hervorgerufen. Der Zusatz von reinem Epinephrin oder den überstehenden Lösungen, die das Epinephrin aus den Albumin-Kügelchen enthalten, verursacht eine Entspannung der Gewebe. Die Konzentration an freigesetztem Epinephrin (in Mikrogramm/ml),

die benötigt wird zur Entspannung des durch Histamin kontrahierten Trachealgewebes wurde bestimmt. Verglichen wurde mit Epinephrin, das analog getestet wurde, um die Aktivität des freigesetzten Epinephrins festzustellen.

Folgende Tabelle zeigt die gewonnenen Ergebnisse:

Zusammensetzung der Kügelchen, aus denen der Wirkstoff stammt	z. Bad mit Tracheal- gewebe zugesetzte Wirkstoffmenge (Mikrogramm/ml)	% Entspannung des Gewebes
A reines 1-Epinephrin (Vergleich)	0,1–0,2	100
B HSA = 78%, Epinephrin (epi) = 12,5%, L(+)-Ascorbinsäure = 9,5%, Vernetzungsbedingungen 68°C, 2,5 Std.	0,1	100
C HSA = 73,8%, epi = 21,2%, L(+)-Ascorbinsäure = 5%, Vernetzungsbedingungen 100°C, 1 Std.	0,1	100
D HSA = 86,9%, epi = 8,7%	0,01	25
L(+)-Ascorbinsäure = 4,4%, Vernetzungsbedingungen 100°C, 6 Std.	0,02	75
E HSA = 87,3%, epi = 8,8%	0,03	100
L(+)-Ascorbinsäure = 3,9%	0,01	27
Vernetzungsbedingungen 110°C, 1 Std.	0,02	53
	0,03	73
	0,05	82
	0,10	100
F HSA = 87,7%, epi = 8,8%, L(+)-Ascorbinsäure = 3,5%, Vernetzungsbedingungen 110°C, 4 Std.	0,01	6
	0,02	31
	0,03	53
	0,05	71
	0,10	100
G HSA = 88,1%, epi = 8,8%, L(+)-Ascorbinsäure = 3,1%, Vernetzungsbedingungen 115°C, 1 Std.	0,01	32
	0,02	72
	0,03	84
	0,05	91
	0,10	100
H HSA = 87,5%, epi = 8,8%, L(+)-Ascorbinsäure = 3,7%, Vernetzungsbedingungen 120°C, 6 Std.	0,01	25
	0,02	75
	0,03	92
	0,05	100
I HSA = 86,9%, epi = 8,7%, L(+)-Ascorbinsäure = 4,4%, Vernetzungsbedingungen 130°C, 6 Std.	0,01	0
	0,02	7
	0,03	22
	0,04	37
	0,10	67
	0,20	100
J HSA = 87,5%, epi = 8,8%, L(+)-Ascorbinsäure = 3,7%, Vernetzungsbedingungen 145°C, 6 Std.	0,01	0
	0,03	7
	0,04	11
	0,05	19
	0,10	33
	0,20	67
	0,30	89
	0,40	100
K HSA = 87,8%, epi = 8,9%, L(+)-Ascorbinsäure = 3,3%, Vernetzungsbedingungen 165°C, 6 Std.	0,01	0
	0,04	10
	0,10	30
	0,20	50
	0,30	60
	0,40	80
	0,50	100
L HSA = 81,8%, epi = 12,3%, L(+)-Ascorbinsäure = 5,9%, Vernetzungsbedingungen 4 Std. in 500 ml Baum- wollsaamenöl, enthaltend 13 ml n-Butanol und 2,0 ml 25% Glutaraldehyd, 25°C	0,1	100

Zusammensetzung der Kügelchen, aus denen der Wirkstoff stammt	z. Bad mit Tracheal- gewebe zugesetzte Wirkstoffmenge (Mikrogramm/ml)	% Entspannung des Gewebes
M HSA = 67,3%, epi = 20,2%, L(+)-Ascorbinsäure = 12,5%, Vernetzungsbedingungen 4 Std. in 500 ml Baum- wollsaamenöl, enthaltend 13 ml n-Butanol und 2,0 ml 37% Formaldehyd, 25°C	1,4 2,8	0 0

HSA = menschliches Serumalbumin

Wie aus den Versuchen A bis K ersichtlich, tritt ein gewisser Aktivitätsverlust des Epinephrins bei steigenden Vernetzungstemperaturen ein. Kein signifikanter Aktivitätsverlust (beim Vergleich mit reinem Epinephrin) zeigt sich, solange die Vernetzungstemperaturen unterhalb 130 °C liegen. Überraschenderweise verbleibt jedoch auch nach einer Vernetzung während 6 Std. bei 165 °C eine signifikante Epinephrin-Aktivität. Auch bei hoher Temperatur vernetzte Mikrokügelchen sind daher wirksam und zur parenteralen Injektion beim Menschen geeignet.

Das in mit Glutaraldehyd vernetzte Kügelchen eingeschlossene Epinephrin behält im wesentlichen seine Aktivität voll bei. In Beispiel 2 wurde gezeigt, dass 4stündiges Vernetzen mit Glutaraldehyd etwa 6stündigem thermischem Vernetzen bei 140 bis 150 °C gleichwertig ist. Da bei der Vernet-

zung mit Glutaraldehyd, wenn überhaupt, nur geringer Aktivitätsverlust eintritt (verglichen mit einem schwachen Aktivitätsverlust bei thermischem Vernetzen bei 140 bis 150 °C), kann die chemische Vernetzung beim Epinephrin vorzuziehen sein, falls man dichter vernetzte Kügelchen anstrebt.

Formaldehyd ist nicht das Vernetzungsmittel der Wahl für Epinephrin enthaltende Kügelchen.

Beispiel 8

Das Verfahren von Beispiel 7 wird wiederholt unter Verwendung von Kügelchen aus menschlichem Serumalbumin, die den Bronchienerweiterer Salbutamol enthalten. Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle:

Salbutamol enthaltende Mikrokügelchen

Zusammensetzung der Kügelchen	Dosis (Mikrogramm/ml)	% Entspannung
A Salbutamol (Vergleich)	0,1	100
B HSA = 88,4%, Salbutamol = 6,3% L(+)-Ascorbinsäure = 4,6%, Vernetzungsbedingungen 115°C, 1 Std.	0,1	100
C HSA = 86,1%, Salbutamol = 7,9%, L(+)-Ascorbinsäure = 6,0%, Vernetzungsbedingungen 4 Std. in 500 ml Baum- wollsaamenöl, enthaltend 13 ml n-Butanol und 2,0 ml Glutaraldehyd, 25°C	1,0	100

Während die einstündige Vernetzung bei 115 °C die Aktivität des Salbutamols nicht beeinträchtigt, scheint die Aktivität dieses Wirkstoffs durch Vernetzung mit Glutaraldehyd herabgesetzt zu werden.

Beispiel 9

Das Verfahren von Beispiel 7 wurde wiederholt unter Verwendung von Kügelchen aus menschlichem Serumalbumin, die den Bronchienerweiterer Terbutalin enthalten. Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle:

Zusammensetzung der Kügelchen	Dosis (Mikrogramm/ml)	% Entspannung
A reines Terbutalin (Vergleich)	0,1–1,0	100
B HSA = 78,7%, Terbutalin = 11,7%, L(+)-Ascorbinsäure = 9,6%, Vernetzungsbedingungen 68 °C, 2,5 Std.	0,1–1,0	100
C HSA = 82,9%, Terbutalin = 12,5%, L(+)-Ascorbinsäure = 4,6%, Vernetzungsbedingungen 105 °C, 1 Std.	0,1–1,0	100
D HSA = 81,5%, Terbutalin = 12,3%, L(+)-Ascorbinsäure = 6,2%, Vernetzungsbedingungen 4 Std. in 500 ml Baum- wollsaamenöl, enthaltend 13 ml n-Butanol und 2,0 ml 25% Glutaraldehyd, 25°C	0,1–1,0	100

Die obigen Werte zeigen, dass keines der angewandten thermischen oder chemischen Vernetzungsverfahren eine nachteilige Wirkung auf die Aktivität des Bronchienerweiterers Terbutalin hatte.

Beispiel 10

Die Aktivität von Kügelchen aus menschlichem Serumalbumin, die das Antitumormittel 5-Fluorouracil enthalten, wurde getestet in einem Versuch mit L-Zellen von Mäusen.

L-676-Mausembryo-Fibroblasten wurden in flüssigen Schüttelkulturen aus dem Medium Swims-67G gezüchtet, das durch Zusatz von 5% fötalem Kälberserum verstärkt und mit 1% 200-millimolarem Glutamin ergänzt worden war.

Die freien Wirkstoffe (ohne Träger), die zu den Vergleichsversuchen eingesetzt wurden, wurden entweder in sterilem destilliertem Wasser oder Aceton gelöst und zum Wachstumsmedium zugegeben. Wurde Aceton als Lösungs-

mittel verwendet, so waren dessen Konzentrationen stets genügend niedrig, um für das Wachstumsmedium nichttoxisch zu bleiben.

Die den Wirkstoff enthaltenden Kügelchen aus menschlichem Serumalbumin wurden im Wachstumsmedium suspendiert. Hierzu wurde ein Wasserbad mit Schallquelle verwendet. Die mikroskopische Untersuchung ergab, dass keine Kügelchen zerstört worden waren.

Ein 10%iges (Volumen/Volumen) Inokulum von L-Zellen wurde verwendet in einem Endvolumen von 20 ml Wachstumsmedium, das die suspendierten, wirkstoffhaltigen Mikrokügelchen oder den freien Wirkstoff im Vergleichsversuch enthielt. Die Ergebnisse wurden durch direkte Zellenzählung nach dreitägiger Inkubation auf einer Schüttelmaschine (200 Umdrehungen/Minute) bei 37°C ermittelt und ausgedrückt in prozentualer Wachstumsinhibierung, verglichen mit unbehandelten Zellkulturen. Alle Tests wurden in Doppelversuchen ausgeführt.

Prozentuale Inhibierung von L-Zellwachstum nach 72 Std.

Anti-Tumormittel	Wirkstoffkonzentration in der L-Zellsuspension (Mikrogramm/ml)			
	1	10	50	100
Reines 5-Fluorouracil (5-FU) (Vergleich)	67%	88%	93%	93%

5-FU in verschiedenen vernetzten Albumin-Mikrokugeln

	Wirkstoffkonzentration in den Kugeln (Mikrogramm 5-FU/ml Zellkultur)	% L-Zell- inhibierung
Probe A		
Zusammensetzung der Kugeln:		
99% HSA, 1% 5-FU	0,3	39
Vernetzungsbedingungen: 24 Std. in 500 ml Baumwollsaamenöl, enthaltend 13 ml n-Butanol, und 2,0 ml 37% Formaldehyd, 25°C	3,0	99
Probe B		
Zusammensetzung: 86,6% HSA, 13,4% 5-FU		
Vernetzungsbedingungen: 24 Std. in 500 ml Baumwollsaamenöl, enthaltend 13 ml n-Butanol und 2,0 ml 37% Formaldehyd, 25°C	4,0	98
Probe C		
Zusammensetzung: 98,7% HSA, 1,3% 5-FU		
Vernetzungsbedingungen: 140°C in Baumwollsaamenöl, 2 Std.	0,4 3,9	47 95
Probe D		
Zusammensetzung: 86,9% HSA, 13,1% 5-FU (höhere Konzentration als in Probe C)		
Vernetzungsbedingungen: 140°C in Baumwollsaamenöl, 2 Std.	3,9	99
Probe E		
Zusammensetzung: 83,1% HSA, 16,9% 5-FU		
Vernetzungsbedingungen: 5,5 Std. in 500 ml Baumwoll- saamenöl, enthaltend 13 ml n-Butanol und 2,0 ml 37% Formaldehyd, 25°C	5,1	100

Diese Werte zeigen, dass sowohl thermisch als auch chemisch vernetzte, 5-Fluorouracil enthaltende Albuminkügelchen nach dem Wirkstoffeinschluss eine hohe Aktivität haben.

Beispiele 11 bis 17
Nach der in Beispiel 10 beschriebenen Methode wurden andere Anti-Tumormittel enthaltende Albuminkügelchen auf die Aktivität im Vergleich zur Aktivität des freien Wirkstoffs getestet. Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle:

Beispiel	Zusammensetzung der Kügelchen	Wirkstoffkonzentration in den Kügelchen (μ Wirkstoff/ml Zellkultur)	% L-Zell- inhibierung
11 Chlorambucil	a) 95,5% HSA	1,35	28
	4,5% Chlorambucil	13,5	89
	Vernetzungsbedingungen 24 Std. in 500 ml Baumwollsaamenöl, enthaltend 13 ml n-Butanol und 2,0 ml 37% Formaldehyd		
12 Hydrocortisonacetat	b) Vergleich – freies Chlorambucil	1	0
		10	68
		50	97
	a) 83,9% HSA		
	16,1% Hydrocortisonacetat		
13 Colchicin	Vernetzungsbedingungen 120°C, 1 Std. in Baumwollsaamenöl	4,8	88
	b) Vergleich – freies Hydrocortisonacetat	1,0	0
		10,0	0
		50,0	73
		100,0	88
14 Hydroxyharnstoff	a) 83,1% HSA, 16,9 Colchicin	5,1	99
	Vernetzungsbedingungen 143°C, 1 Std. in Baumwollsaamenöl		
	b) 83,4% HSA, 16,6% Colchicin		
	Vernetzungsbedingungen 5,5 Std. in 500 ml Baumwollsaamenöl, enthaltend 13 ml n-Butanol und 2,0 ml 25% Glutaraldehyd	5,0	93
	c) Vergleich – freies Colchicin	1,0	91
15 6-Thioguanin		10,0	99
	a) 86,4% HSA, 16,6% Hydroxyharnstoff		
	Vernetzungsbedingungen 125°C, 1 Std. in Baumwollsaamenöl	5,0	25
	b) Vergleich – freier Hydroxyharnstoff	1,0	0
		10,0	22
16 Busulfan		5,3	96
	a) 82,2% HSA, 17,8% 6-Thioguanin,		
	Vernetzungsbedingungen 123°C, 1 Std. in Baumwollsaamenöl		
	b) Vergleich – freies 6-Thioguanin	1,0	65
		10,0	88
17 6-Merkaptopurin		50,0	92
	a) 83,2% HSA, 16,8% Busulfan		
	Vernetzungsbedingungen 115°C, 1 Std. in Baumwollsaamenöl	25,0	56
	b) Vergleich – freies Busulfan	25,0	69
	a) 83,0% HSA, 17,0% 6-Merkaptopurin.		
	Vernetzungsbedingungen 130°C, 1 Std. in Baumwollsaamenöl	50	95
	b) Vergleich – freies 6-Merkaptopurin	50	94