(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2006 013 531 A1** 2007.09.27

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2006 013 531.8**
(22) Anmeldetag: **24.03.2006**
(43) Offenlegungstag: **27.09.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 9/14*** (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(71) Anmelder:
LTS Lohmann Therapie-Systeme AG, 56626 Andernach, DE

(74) Vertreter:
Flaccus, R., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 50389 Wesseling

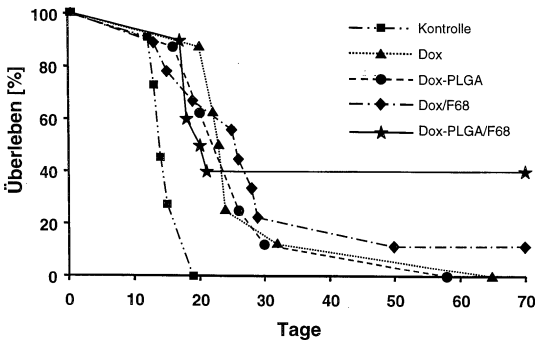
(72) Erfinder:
Kreuter, Jörg, Prof. Dr., 61350 Bad Homburg, DE; Gelperina, Svetlana, Dr., Moskau, RU; Mksimenko, Olga, Dr., Moskau, RU; Khalanskiy, Alexander, Dr., Moskau, RU

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Polylactid-Nanopartikel**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein System zur gezielten Wirkstoffzufuhr zur Verabreichung eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffes an das zentrale Nervensystems eines Säugers über die Blut-Hirn-Schranke, wobei das System zur gezielten Arzneistoffzufuhr Nanopartikel aus Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-co-glycolid) sowie wenigstens einen pharmakologisch wirksamen Wirkstoff, der in den Nanopartikeln absorbiert, an diese adsorbiert oder in diese eingearbeitet ist, umfasst und entweder TPGS enthält oder einen Überzug aus dem oberflächenaktiven Stoff Pluronic 188, welcher auf den mit Wirkstoff beladenen Nanopartikeln abgeschieden ist, aufweist, sowie Verfahren zur Herstellung des Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr und die Verwendung des Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr zur Behandlung einer Krankheit oder einer Störung des zentralen Nervensystems.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Systeme zur gezielten Zufuhr von pharmakologisch wirksamen Wirkstoffen an das zentrale Nervensystem (ZNS) eines Säugers. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung nanopartikuläre Systeme zur gezielten Wirkstoffzufuhr, welche in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke eines Säugers zu überwinden. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung mit Wirkstoff beladene Nanopartikel auf Basis von Polylactiden und/oder Polylactid-Coglycoliden, Verfahren zur Herstellung mit Wirkstoff beladener Nanopartikel auf Basis von Polylactiden und/oder Polylactid-Coglycoliden sowie die Verwendung von mit Wirkstoff beladenen Nanopartikeln auf Basis von Polylactiden und/oder Polylactid-Coglycoliden zur Behandlung von Krankheiten oder Störungen des zentralen Nervensystems, insbesondere zur Behandlung von neuronalem Krebs.

[0002] Krankheiten und Störungen des zentralen Nervensystems (ZNS) können durch Verabreichung von Wirkstoffen behandelt werden, welche die Funktion des Nervensystems beeinflussen. Diese Wirkstoffe werden dem bedürftigen Patienten gewöhnlich durch konventionelle orale Verabreichung oder Injektion verabreicht. Leider sind viele Wirkstoffe, wie z.B. Adenosin, ß-Endorphin, synthetische Analoga endogener Peptide, exzitatorische und inhibitorische Aminosäuren und trophische Faktoren, entweder gar nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden oder nur in Mengen, die zur Erreichung einer therapeutischen Wirkung nicht ausreichen. Derartige Wirkstoffe erzielen nur daran eine therapeutische Wirkung, wenn sie direkt in das Gehirn verabreicht werden, beispielsweise durch direkte ZNS-Infusion.

[0003] Als eine Alternative zur direkten ZNS-Infusion wird in dem US-Patent Nr. 6,117,454 ein Verfahren zur Zuleitung von pharmazeutisch wirksamen Wirkstoffen über die Blut-Hirn-Schranke eines Säugers vorgeschlagen, wobei Nanopartikel verwendet werden sollen, um Arzneistoffe oder Diagnostika durch Überwinden der Blut-Hirn-Schranke gezielt dem ZNS zuzuführen. Gemäß US 6,117,454 wird während oder nach der Polymerisation geeigneter Polymere, wie Butylcyanoacrylat, ein Wirkstoff zugegeben, welcher entweder in die resultierenden Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel eingearbeitet oder an deren Oberfläche adsorbiert wird. Diese Nanopartikel-Wirkstoff-Komplexe sollen in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und den Wirkstoff gezielt dem ZNS zuzuführen, wenn sie mit einem geeigneten oberflächenaktiven Stoff überzogen sind.

[0004] Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonolaureat (Tween® 20), Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonopalmitat (Tween® 40), Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonostearat (Tween® 60), Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonooleat (Tween® 80) und Mischungen daraus sollen geeignete oberflächenaktive Stoffe sein, welche die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch die wirkstoffbeladenen Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel ermöglichen.

[0005] In dem o.g. Dokument wird dargelegt, dass grundsätzlich jeder beliebige Wirkstoff in die mit einem oberflächenaktiven Stoff überzogenen Nanopartikel eingearbeitet oder an diese gebunden werden und zum Gehirn transportiert werden kann, ohne dass dabei eine Notwendigkeit zur Veränderung der Struktur des Wirkstoffs besteht. Somit scheint US 6,117,454 das erste universelle Verfahren zur gezielten Zufuhr eines Wirkstoffs an das ZNS durch Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bereitzustellen.

[0006] Bedenken bezüglich der Wahrscheinlichkeit toxischer Nebenwirkungen der oberflächenaktiven Substanzen, welche zum Überziehen der erhaltenen Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel eingesetzt werden, sowie der Wunsch, den Prozess der Herstellung wirkstoffbeladener Nanopartikel zu vereinfachen, führten zur Entwicklung eines vereinfachten und potentiell weniger toxischen Verfahrens zur Herstellung von Nanopartikeln, welches in WO 98/56361 offenbart ist.

[0007] WO 98/56361 lehrt, dass die Verwendung oberflächenaktiver Stoffe nicht mehr erforderlich ist, wenn die Nanopartikel unter Verwendung von Dextran 12.000 oder Polysorbat 85 (Polyoxyethylen 20 Sorbitantrioleat; Tween® 85) als Stabilisatoren während der Polymerisation der Butylcyanoacrylatmonomere hergestellt werden. Es wurde gezeigt, dass Dalargin, das an die stabilisierten Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel adsorbiert ist, die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und dass Amitriptylin, das an durch Polysorbat 85 stabilisierte Nanopartikel adsorbiert ist, in höheren Konzentrationen im Gehirn akkumuliert als Amitriptylin als solches.

[0008] Es besteht jedoch nach wie vor ein Bedarf an alternativen Systemen mit Wirkstoff beladener Nanopartikel zur gezielten Zufuhr von Wirkstoffen an das ZNS eines Säugers über die Blut-Hirn-Schranke, um entweder eine Verbesserung der Wirksamkeit, der Spezifizität, der Toxizität oder der Einfachheit der Herstellung, oder mehrerer dieser Faktoren, zu erzielen.

[0009] Es war daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes System zur gezielten Wirkstoffzu-

fuhr zur Verabreichung eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffes an das zentrale Nervensystem eines Säugers über dessen Blut-Hirn-Schranke bereitzustellen.

[0010] Dieses Ziel wurde durch ein System zur gezielten Wirkstoffzufuhr erreicht, welches Nanopartikel auf Basis von Poly(DL-lactid) (PLA) und/oder Poly(DL-lactid-co-glycolid) (PLGA) umfasst, wobei ein pharmakologisch wirksamer Wirkstoff in den Nanopartikeln absorbiert, an diese adsorbiert und/oder in die Nanopartikel eingearbeitet ist, und wobei die Nanopartikel entweder TPGS enthalten oder einen Überzug aus dem oberflächenaktiven Stoff Poloxamer 188 aufweisen, der auf den mit Wirkstoff beladenen Nanopartikeln abgeschieden ist.

[0011] Es wird darauf hingewiesen, dass sich der Begriff "mit Wirkstoff beladene Nanopartikel", so wie er hier verwendet wird, auf Nanopartikel bezieht, die einen pharmakologisch wirksamen Wirkstoff umfassen. Ein pharmakologisch wirksamer Wirkstoff kann entweder ein Therapeutikum oder ein Diagnostikum sein. Somit umfassen die "mit Wirkstoff beladenen Nanopartikel" der Erfindung wenigstens ein Therapeutikum und/oder wenigstens ein Diagnostikum, das/die in den Nanopartikeln absorbiert, an diese adsorbiert oder in diese eingearbeitet ist/sind.

[0012] Der Begriff "Blut-Hirn-Schranke" bezieht sich, so wie er hier verwendet wird, auf die Blut-Hirn-Schranke als solche, d.h. das Endothelium der Hirngefäße, die basale Membran und die neuroglialen Zellen. Die Blut-Hirn-Schranke dient der Steuerung des Transfers von Substanzen in das Gehirn. Der Begriff "Blut-Hirn-Schranke" bezeichnet, so wie er hier verwendet wird, ebenfalls die Blut-Rückenmark-Schranke und die Blut-Retina-Schranke.

[0013] Polylactide (PLA), auch Polymilchsäuren genannt, sind Polyester auf Basis von Milchsäure. Polylactide sind Polyhydroxysäuren. Sie sind biokompatibel und biologisch abbaubar.

[0014] Die Eigenschaften der Polylactide hängen in erster Linie von ihrem Molekulargewicht, dem Grad ihrer Kristallinität und dem Anteil der Copolymere, falls zutreffend, ab. Die Glassübergangstemperatur, die Schmelztemperatur, die Reißfestigkeit und der E-Modul der Polylactide nehmen mit zunehmendem Molekulargewicht der Polylactide zu, die Bruchdehnung jedoch nimmt ab.

[0015] Polylactide können durch ringöffnende Polymerisation von Lactiden erhalten werden. Die ringöffnende Polymerisation erfolgt bei Temperaturen zwischen 140 und 180 °C in Gegenwart von Zinnoktoat als Katalysator. Polylactide mit hohem Molekulargewicht können mit diesem Verfahren leicht hergestellt werden.

[0016] Darüber hinaus können hochmolekulare und reine Polylactide direkt aus Milchsäure durch die so genannte Polykondensation gewonnen werden.

[0017] Polylactidcoglycolide (PLGA) sind biologisch abbaubare Polymere, die aus Milchsäure bestehen, welche an Glycolsäure gebunden ist, wobei die jeweiligen Prozentanteile dieser Bestandteile für die Geschwindigkeit der Wirkstofffreisetzung eine wesentliche Rolle spielen. Das Verhältnis von Lactid zu Glycolid kann von 90:10 bis 10:90 betragen, wobei Verhältnisse von 20:80 bis 80:20 bevorzugt und Verhältnisse von 40:60 bis 60:40 stärker bevorzugt sind und ein Verhältnis von 50:50 am stärksten bevorzugt ist. Lactid ist optisch aktiv, und es können alle Verhältnisse von D- und L-Isomeren, in einer Bandbreite von reinem D-Lactid bis hin zu reinem L-Lactid, vorliegen, wobei Racemate 50 % D-Lactid und 50 % L-Lactid umfassen.

[0018] Poloxamere sind nichtionische Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockcopolymere der allgemeinen Formel $HO(C_2H_4O)_a(-C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_aH$. Sie sind in unterschiedlichen Sortierungen erhältlich, die von Flüssigkeiten bis hin zu Feststoffen variieren. Poloxamere werden als Emulgatoren, Lösungsvermittler, oberflächenaktive Stoffe und als Benetzungsmittel für Antibiotika eingesetzt.

[0019] Poloxamer 188 (Pluronic® F68 (BASF Corp.)) ist ein bifunktionelles, oberflächenaktives Blockcopolymer, das mit primären Hydroxylgruppen endet. Es handelt sich um eine nichtionische oberflächenaktive Substanz, die relativ ungiftig ist. Poloxamer 188 hat ein mittleres Molekulargewicht von 8.400, eine Viskosität von 1.000 cP bei 77 °C, einen Trübungspunkt (10 % wässrig) von >100 °C und einen HLB-Wert von >24.

[0020] Poloxamer 185 (Pluronic® P65 (BASF Corp.)) ist ein bifunktionelles, oberflächenaktives Blockcopolymer, das mit primären Hydroxylgruppen endet. Es handelt sich um einen nichtionischen oberflächenaktiven Stoff, der relativ ungiftig ist. Pluronic® P65 hat ein mittleres Molekulargewicht von 3.400, eine Viskosität von 180 cP bei 60 °C, einen Trübungspunkt (10 % wässrig) von 80–84 °C und einen HLB-Wert von 12–18.

[0021] Pluronic® P85 (BASF Corp.); auch als Poloxamer 235 bezeichnet, ist ein bifunktionelles, oberflächenaktives Blockcopolymer, das mit primären Hydroxylgruppen endet. Es handelt sich um eine nichtionische oberflächenaktive Substanz, die relativ ungiftig ist. Pluronic® P85 hat ein mittleres Molekulargewicht von 4.600, eine Viskosität von 310 cP bei 60 °C, einen Trübungspunkt (10 % wässrig) von 83–89 °C und einen HLB-Wert von 12–18.

[0022] Polysorbat 80 (Polyoxethylensorbitanmonooleat, Tween® 80) ist eine nichtionische oberflächenaktive Substanz. Polysorbat 80 weist ein mittleres Molekulargewicht von 1.300, eine Viskosität von 375–480 mPa·s bei 25 °C und einen HLB-Wert von 14–16 auf.

[0023] TPGS (D-α-Tocopherol-Polyethylenglycol-1000-Succinat) ist ein wasserlösliches Derivat des D-α-Tocopherolsuccinats. TPGS wird als wasserlösliche Verabreichungsform für Vitamin E bei Personen mit mangelhafter Fettabsorption, wie beispielsweise chronischer kindlicher Cholestase, verwendet. Es findet auch als ein Enhancer für die Absorption und biologische Verfügbarkeit des wasser-unlöslichen HIV-Protease-Hemmers Amprevanir und von fettlöslichen Vitaminen wie Vitamin D Verwendung. TPGS wird durch Verestern von D-α-Tocopherolsuccinat mit Polyethylenglycol (PEG) 1000 synthetisiert (das Molekulargewicht von PEG 1000 beträgt ungefähr 1000 Dalton. Das Molekulargewicht von TPGS beträgt ungefähr 1.513 Dalton). Es handelt sich um eine blassgelbe, waxartige feste Substanz, die amphipathisch und hydrophil ist. Die Pharmakokinetik von TPGS ist noch nicht abschließend geklärt. TPGS wird vom Lumen des Dünndarms nach Ingestion besser absorbiert als andere Formen von Vitamin E. Der Mechanismus der Absorption von TPGS in Enterocyten ist noch ungeklärt. Aufgrund seines amphipathischen Charakters (enthält sowohl hydrophile als auch lipophile Enden) bildet TPGS seine eigenen Mizellen und benötigt daher zur Bildung von Mizellen keine Gallensalze. TPGS kann die Absorption lipophiler Wirkstoffe verbessern, wenn es zusammen mit diesen formuliert wird. Des Weiteren beruht die Verbesserung der oralen biologischen Verfügbarkeit einiger Wirkstoffe bei Verabreichung zusammen mit TPGS möglicherweise zum Teil auf der Hemmung des P-Glycoproteins im Darm.

[0024] Die erfindungsgemäßen, mit Wirkstoff beladenen PLA-Nanopartikel und PLGA-Nanopartikel können zur gezielten Zufuhr des Wirkstoffs über die Blut-Hirn-Schranke zum zentralen Nervensystem und zur Behandlung von Krankheiten oder Störungen des zentralen Nervensystems oder für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von Krankheiten oder Störungen des zentralen Nervensystems eingesetzt werden.

[0025] Fig. 1 zeigt ein Diagramm, welches das Überleben von Ratten, die ein intrakraniales 101/8-Glioblastom aufwiesen, nach einer Chemotherapie mit unterschiedlichen, Doxorubicin enthaltenden Nanopartikel-Zubereitungen darstellt.

[0026] Fig. 2 zeigt ein Diagramm, welches das Überleben von Ratten, die ein intrakraniales 101/8-Glioblastom aufwiesen, nach einer Chemotherapie mit unterschiedlichen, Doxorubicin und TPGS enthaltenden Nanopartikel-Zubereitungen wiedergibt.

[0027] Die wirkstoffbeladenen PLA- und PLGA-Nanopartikel der Erfindung können entweder durch a) Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahren oder durch b) Doppel-Emulsions-Verfahren (Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion) hergestellt werden

a) Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahren

[0028] Typischerweise werden das Polymer und der Wirkstoff in einem organischen Lösemittel gelöst. Diese organische Phase wird langsam, unter Rühren, in eine wässrige Lösung eines Stabilisators gegossen. Die Mischung wird dann unter Verwendung eines Hochgeschwindigkeits-Scherhomogenisators emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wird dann bei hohem Druck durch einen Hochdruck-Homogenisator geleitet. Das organische Lösemittel wird entweder durch Verdampfen bei Raumtemperatur und normalem Druck unter Rühren entfernt oder durch schnelles Verdampfen bei vermindertem Druck. Während dieses Vorgangs verfestigen sich die Nanotröpfchen.

[0029] Die sich ergebende Nanosuspension wird durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert. Für die Lagerung wird ein Gefrierschutzmittel hinzugegeben, vorzugsweise 5 % (Gew./Vol.) Mannitol. Dann wird die Suspension in Fläschchen gefüllt, bei –35 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

[0030] Sollen bei der Herstellung des Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr zusätzliche Verbindungen wie Cetylphosphat, Kaliumcholesterinsulfat oder Tocopherolsuccinat als Emulgatoren und/oder Gegen-Ionen eingesetzt werden, so werden das Polymer und die Lipid-Verbindung in einem organischen Lösemittel gelöst, und

der Wirkstoff wird in Wasser gelöst. Die organische und die wässrige Lösung werden miteinander gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird die Mischung in eine gerührte, einen Stabilisator enthaltende wässrige Lösung gegossen und danach wie oben beschrieben weiter verarbeitet.

b) Doppel-Emulsions-Verfahren

[0031] Typischerweise wird das Polymer in einem organischen Lösemittel und der Wirkstoff in Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wird zu der organischen Phase gegeben. Die Mischung wird emulgiert. Die erhaltene WÖ-Emulsion wird zu einer wässrigen Lösung eines Stabilisators gegeben und dann weiter emulgiert. Die resultierende grobe Emulsion wird durch einen Hochdruck-Homogenisator geleitet. Der Homogenisierungsschritt wird mehrfach wiederholt, um eine stabile WÖW-Emulsion zu erzeugen. Dann wird das organische Lösemittel durch langsames Verdampfen bei Raumtemperatur und normalem Druck, entfernt.

[0032] Es besteht die Möglichkeit, den Wirkstoff und einen zusätzlichen Emulgator, wie beispielsweise γ-Cyclodextrin, in Wasser zu lösen, bevor die Lösung zu der organischen Phase hinzugegeben wird.

[0033] Die erhaltene Nanosuspension wird durch einen glasgesinterten Filter gefiltert. Für die Lagerung wird ein Gefrierschutzmittel hinzugefügt und die Nanosuspension in Fläschchen eingefüllt und sodann gefriergetrocknet.

[0034] Die erhaltenen Nanopartikel-Formulierungen sind auf Resuspendierbarkeit, Partikelgröße, Wirkstoffbeladung (theoretisch) und Wirkstoffgehalt zu untersuchen.

[0035] Es wird darauf hingewiesen, dass die detaillierte Beschreibung und die spezifischen Beispiele zwar bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung aufzeigen jedoch nur der Erläuterung dienen, da verschiedene Änderungen und Modifikationen innerhalb des Umfangs der Erfindung für den Fachmann aus der vorliegenden Beschreibung, den begleitenden Zeichnungen sowie aus den Ansprüchen ersichtlich werden.

[0036] Das erfindungsgemäße System zur gezielten Wirkstoffzufuhr umfasst Nanopartikel auf der Basis von Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-co-glycolid und wenigstens einen pharmakologisch wirksamen Wirkstoff, und es enthält entweder TPGS oder es umfasst einen Überzug aus einem oberflächenaktiven Stoff, der auf den mit Wirkstoff beladenen Nanopartikeln abgeschieden ist, wobei der oberflächenaktive Stoff Poloxamer 188 ist.

[0037] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform weisen die Nanopartikel des Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr einen Durchmesser von weniger als 1.000 nm, vorzugsweise einen Durchmesser zwischen 100 und 800 nm und mit größtem Vorzug einen Durchmesser zwischen 130 und 160 nm auf.

[0038] Die erfindungsgemäßen Nanopartikel auf PLA- und/oder PLGA-Basis können mit praktisch jedem pharmakologisch wirksamen Wirkstoff beladen werden, um diesen pharmakologisch wirksamen Wirkstoff, z.B. ein Therapeutikum oder ein Diagnostikum, über die Blut-Hirn-Schranke eines Säugers an das ZNS dieses Säugers zu verabreichen.

[0039] Das Therapeutikum kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Wirkstoffen, die an synaptischen und Neuroeffektor-Knotenpunkten wirken; allgemeinen und lokalen Analgetika und Anästhetika; Hypnotika und Sedativa; Wirkstoffen für die Behandlung psychiatrischer Störungen wie beispielsweise Depressionen und Schizophrenie; Antiepileptika und Antikonvulsiva; Wirkstoffen zur Behandlung der Huntington-Krankheit, des Alterns und der Alzheimer-Krankheit; exzitatorischen Aminosäure-Antagonisten und neurotropen Faktoren und neurogenerativen Mitteln; trophischen Faktoren; Wirkstoffen, die zur Behandlung von Traumata des zentralen Nervensystems oder Schlaganfällen vorgesehen sind; Wirkstoffen zur Behandlung von Sucht und Drogenmissbrauch; autakoiden und entzündungshemmenden Wirkstoffen; chemotherapeutischen Mitteln für Parasiten-Infektionen und mikrobiell bedingte Krankheiten; immunosuppressiven Mitteln und Antikrebs-Mitteln; Hormonen und Hormon-Antagonisten; Schwermetallen und Schwermetall-Antagonisten; Antagonisten für nichtmetallische toxische Mittel; zytostatischen Mitteln zur Behandlung von Krebs; diagnostischen Substanzen zur Verwendung in der Nuklearmedizin; immunoaktiven und immunoreaktiven Mitteln; Transmittern und ihren jeweiligen Rezeptor-Agonisten und Rezeptor-Antagonisten, ihren entsprechenden Vorläufern oder Metaboliten; Antibiotika, Antispasmodika, Antihistaminen, Mitteln gegen Nausea, Relaxantien, Stimulantia "Sense" und "Anti-Sense-"Oligonukleotiden, Cerebral-Dilatatoren, Psychotropika, gegen Manie gerichtete Mittel, gefäßerweiternde und -verengende Mittel Antihypertensiva, Mittel zur Migräne-Behandlung, Hypnotika, hyperglykämische oder hypoglykämische Mittel, mineralische oder der Ernährung dienende Mittel, gegen Fettleibigkeit ge-

richtete Mittel, Anabolika und Antiasthmatika sowie Mischungen daraus.

[0040] Bevorzugte Therapeutika sind Antikrebs-Mittel, vorzugsweise antineoplastische Mittel. Die antineoplastischen Mittel können ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Alkaloiden, alkylierenden Mitteln wie Alkylsulfonaten, Aziridinen, Ethyleniminen und Methylmelaminen, Stickstofflosten, Nitrosoharnstoffen, Antibiotika und Analoga, vorzugsweise Anthracyclinen, Antimetaboliten wie Analoga der Folsäure, Antagonisten der Folsäure, Purin-Analoga und Pyrimidin-Analoga, Enzymen, Immunmodulatoren, Immuntoxinen, monoklonalen Antikörpern und Platinkomplexen.

[0041] Besonders bevorzugte antineoplastische Mittel können ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus 9-Aminocamptothecin, Docetaxel, Ecteinascidinen, Etoposid, Irinotecan, Paclitaxel, Rubitecan, Teniposid, Topotecan, Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Busulfan, Improsulfan, Piposulfan, Carboquon, Uredepa, Altretamin, Triethylenmelamin, Triethylenphosphoramid, Triethylenthiophosphoramid, Chlorambucil, Chlornaphazin, Cyclophosphamid, Estramustin, Ifosfamid, Mechlorethamin, Mechlorethaminoxidhydrochlorid, Melphalan, Novembichin, Perfosfamid, Phenesterin, Prednimustin, Trichlormethin, Trofosfamid, Uracil-Lost, Carmustin, Chlorozotocin, Fotemustin, Lomustin, Nimustin, Ranimustin, Dacarbazin, Mannomustin, Mitobronitol, Mitolactol, Pipobroman, Temozolomid, Aclacinomycinen, Anthramycin, Azaserin, Bleomycinen, Cactinomycin, Carubicin, Chromomycin, Dactinomycin, Daunorubicin, 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin, Doxorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Menogaril, Mitomycinen, Mycophenolsäure, Nogalamycin, Olivomycinen, Peplomycin, Pirarubicin, Plicamycin, Porfiromycin, Puromycin, Streptonigrin, Streptozocin, TNP-470, Tubercidin, Valrubicin, Zinostatin, Zorubicin, Denopterin, Edatrexat, Methotrexat, Nolatrexed, Pemetrexed, Piritrexim, Pteropterin, Ralitrexed, Trimetrexat, Cladribin, Fludarabin, 6-Mercaptopurin, Thiamiprin, Thioguanin, Tiazofurin, Ancitabin, Azacitidin, 6-Azauridin, Capecitabin, Carmofur, Cytarabin, Decitabin, Doxifluridin, Emitefur, Enocitabin, Floxuridin, Fluorouracil, Gemcitabin, Tegafur, L-Asparaginase, Ranpirnase, Bropirimin, Interferon-α, Interferon-γ, Interleukin-2, Lentinan, Propagermanium, PSK®, Roquinimex, Sizofiran, Ubenimex, Denileukin Diftitox, Alemtuzumab, Edrecolomab, Gemtuzumab Ozogamicin, Ibritumomab Tiuxetan, Rituximab, Tositumomab ^{131}I, Trastuzumab, Carboplatin, Cisplatin, Lobaplatin, Miboplatin, Oxaliplatin, Amsacrin, Arsentrioxid, Bisantren, Defosfamin, Demecolcin, Diaziquon, Eflornithin, Elliptiniumacetat, Etoglucid, Fenretinid, Flavopiridol, Galliumnitrat, Hydroxyharnstoff, Imatinib, Liarozol, Lonidamin, Miltefosin, Mitoguazon, Mitoxantron, Mopidamol, Nitracrin, Pentostatin, Phenamet, Podophyllinsäure-2-ethylhydrazid, Procarbazin, Razoxan, Sobuzoxan, Spirogermanium, Tenuazonsäure, Tirapazamin, Triaziquon und Urethan.

[0042] Das erfindungsgemäße System zur gezielten Wirkstoffzufuhr kann durch ein Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahren oder ein Doppel-Emulsions-Verfahren hergestellt werden.

[0043] Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung eines TPGS enthaltenden wirkstoffbeladenen PLA- und/oder PLGA-Nanopartikel-Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr umfasst die Schritte:

– Lösen von Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid) sowie wenigstens eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffs und wahlweise einer Lipid-Verbindung in einem organischen Lösemittel, um eine organische Phase zu erhalten;
– Gießen der organischen Phase in eine wässrige Lösung, die TPGS enthält;
– Emulgieren der Mischung, um eine primäre Emulsion zu erhalten;
– Homogenisieren der primären Emulsion;
– Entfernen des organischen Lösemittels aus der primären Emulsion; und
– Filtern der resultierenden Nanosuspension, welche mit Wirkstoff beladene Nanopartikel enthält.

[0044] Ein weiteres bevorzugtes Verfahren zur Herstellung eines TPGS enthaltenden wirkstoffbeladenen PLA- und/oder PLGA-Nanopartikel-Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr umfasst die Schritte:

– Lösen von Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid) in einem organischen Lösemittel, um eine organische Phase zu erhalten;
– Lösen wenigstens eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffs in einer wässrigen Lösung;
– Gießen der wässrigen Lösung in die organische Phase;
– Emulgieren der Mischung, um eine primäre Emulsion zu erhalten;
– Gießen der primären Emulsion in eine wässrige TPGS-Lösung;
– Homogenisieren der Mischung aus primärer Emulsion und wässriger TPGS-Lösung;
– Entfernen des organischen Lösemittels aus der Mischung aus primärer Emulsion und wässriger Lösung eines Stabilisators; und
– Filtern der resultierenden Nanosuspension, welche mit Wirkstoff beladene Nanopartikel enthält.

[0045] Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung eines mit Poloxamer 188 überzogenen wirkstoffbeladenen

PLA- und/oder PLGA-Nanopartikel-Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr umfasst die Schritte:
- Lösen von Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid) und wenigstens eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffes sowie wahlweise einer Lipid-Verbindung in einem organischen Lösemittel, um eine organische Phase zu erhalten;
- Gießen der organischen Phase in eine wässrige Lösung, die wahlweise einen Stabilisator enthält;
- Emulgieren der Mischung, um eine primäre Emulsion zu erhalten;
- Homogenisieren der primären Emulsion;
- Entfernen des organischen Lösemittels aus der primären Emulsion;
- Filtern der resultierenden Nanosuspension, welche mit Wirkstoff beladene Nanopartikel enthält, und
- Überziehen der Nanopartikel mit Poloxamer 188.

[0046] Ein weiteres bevorzugtes Verfahren zur Herstellung eines mit Poloxamer 188 überzogenen wirkstoffbeladenen PLA- und/oder PLGA-Nanopartikel-Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr umfasst die Schritte:
- Lösen von Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid) in einem organischen Lösemittel, um eine organische Phase zu erhalten;
- Lösen wenigstens eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffs in einer wässrigen Lösung;
- Gießen der wässrigen Lösung in die organische Phase;
- Emulgieren der Mischung, um eine primäre Emulsion zu erhalten;
- Gießen der primären Emulsion in eine wässrige Lösung eines Stabilisators;
- Homogenisieren der Mischung aus primärer Emulsion und wässriger Lösung eines Stabilisators;
- Entfernen des organischen Lösemittels aus der Mischung aus primärer Emulsion und wässriger Lösung eines Stabilisators;
- Filtern der resultierenden Nanosuspension, welche mit Wirkstoff beladene Nanopartikel enthält; und
- Überziehen der Nanopartikel mit Poloxamer 188.

[0047] Bevorzugte Diagnostika und Therapeutika, insbesondere antineoplastische Mittel, für die Herstellung des erfindungsgemäßen Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr wurden weiter oben im Einzelnen aufgeführt.

[0048] Die bevorzugten organischen Lösemittel für die Herstellung des erfindungsgemäßen Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Dichlormethan und Chloroform. Weiterhin kann Ethylacetat als Lösemittel für die Herstellung von PLA- und/oder PLGA-Nanopartikeln verwendet werden, vorausgesetzt, dass der optionale Stabilisator in Ethylacetat löslich ist.

[0049] Darüber hinaus können Mischungen von Dichlormethan und Ethylacetat verwendet werden.

[0050] Die bevorzugte Lipidverbindung ist aus der Gruppe bestehend aus Cetylphosphat, Kaliumcholesterinsulfat und Tocopherolsuccinat ausgewählt.

[0051] Die bevorzugten Stabilisatoren sind Emulgatoren, oberflächenaktive Substanzen oder Gegenionen. Die bevorzugten Stabilisatoren sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyvinylalkoholen, Serumalbumin, γ-Cyclodextrin und Tocopherolpolyethylenglycol-1000-Succinat (TPGS), wobei die Polyvinylalkohole vorzugsweise ein Molekulargewicht von 30–70 dDa aufweisen und das besonders bevorzugte Serumalbumin Humanserumalbumin ist.

[0052] Zum Zwecke der Lagerung kann die erhaltene Nanosuspension der wirkstoffbeladenen Nanopartikel gefriergetrocknet werden, bevor sie mit Poloxamer 188 beschichtet werden. Vorzugsweise wird der Nanosuspension ein Gefrierschutzmittel zugesetzt, bevor die Nanosuspension der Gefriertrocknung unterzogen wird. Ein geeignetes Gefrierschutzmittel ist Mannitol, dieses wird vorzugsweise in einer Menge von 5 (Gew./Vol.). der Nanosuspension hinzugefügt.

[0053] Das Überziehen der mit Wirkstoff beladenen Nanopartikel erfolgt vorzugsweise mit einer Lösung aus Poloxamer 188 in einer Lösung und durch Verstreichenlassen einer Zeitspanne, die ausreicht, damit das oberflächenaktive Mittel die mit Wirkstoff beladenen Nanopartikel überziehen kann.

[0054] Das System zur gezielten Wirkstoffzufuhr zur Verabreichung eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffes an das zentrale Nervensystem eines Säugers über dessen Blut-Hirn-Schranke, wobei das System zur gezielten Arzneistoffzufuhr Nanopartikel aus Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid), ein Therapeutikum und TPGS umfasst oder einen Überzug aus dem oberflächenaktiven Stoff Poloxamer 188 aufweist, der auf den mit Wirkstoff beladenen Nanopartikeln abgeschieden ist, kann zur Behandlung von Krankheiten oder Störungen des zentralen Nervensystems eines Säugers eingesetzt werden. Das System zur gezielten

Wirkstoffzufuhr ist insbesondere zur Verabreichung von pharmakologisch wirksamen Substanzen geeignet, welche auf das zentrale Nervensystem wirken jedoch nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke eines Säugers ohne Modifikation oder Assoziierung mit einem Träger zu überwinden.

[0055] Das erfindungsgemäße System zur gezielten Wirkstoffzufuhr ist besonders nützlich bei der Behandlung neuronaler Krebserkrankungen, da mit diesem System antineoplastische Wirkstoffe über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden können, um diese Antikrebs-Wirkstoffe dem ZNS gezielt zuzuführen.

[0056] Das erfindungsgemäße System zur gezielten Wirkstoffzufuhr ist so zu verabreichen, dass es in den Blutkreislauf eintreten kann, wodurch der Wirkstoff die Blut-Hirn-Schranke erreicht und durch diese hindurch tritt. Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße System zur gezielten Wirkstoffzufuhr oral oder durch Injektion verabreicht, mit größtem Vorzug durch intravenöse Injektion.

Beispiele

1. Herstellung von nanopartikulären Formulierungen

[0057] Verschiedene Sortierungen von Lactel®-Polymeren – Poly(DL-lactid) (PLA) und Poly(DL-lactid-co-glycolid) (PLGA) – wurden bei Absorbable Polymers, USA, erworben; Doxorubicinhydrochlorid wurde von Sicor, Rho, Italien zur Verfügung gestellt; Cetylphosphat, Kaliumcholesterinsulfat, Polyvinylalkohol (PVA) (Molekulargewicht 30–70 kDa) und Humanserumalbumin (HSA) wurden von Sigma bezogen; D-α-Tocopherol-Polyethylenglycol-1000-Succinat (TPGS) wurde von Eastman Chemical Company, USA, bezogen.

[0058] Die wirkstoffbeladenen PLA- und PLGA-Nanopartikel wurden entweder unter Verwendung des Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahrens oder des Doppelemulsionsverfahrens hergestellt.

[0059] Für das Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahren wurden das Polymer und der Wirkstoff üblicherweise in Dichlormethan gelöst. Diese organische Phase wurde langsam unter Rühren in eine wässrige Lösung eines Stabilisators (PVA oder HSA) eingerührt. Die Mischung wurde unter Verwendung eines Hochgeschwindigkeits-Scherhomogenisators (Ultra-Turrax T-25 (IKA)) emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wurde dann bei 400 bar durch den Hochdruck-Homogenisator (APV Micron Lab 40; Gaulin GmbH, Deutschland) geleitet. Das organische Lösemittel wurde durch langsames Verdampfen bei Raumtemperatur und normalem Druck unter Rühren (3 h), oder durch schnelles Verdampfen bei reduziertem Druck (Rotationsverdampfer BUCHI R-200), entfernt. Dabei verfestigten sich die Nanotröpfchen in dem wässrigen System. Die erhaltene Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert, und 5 % (Gew./Vol.) Mannitol wurde als Gefrierschutzmittel hinzugefügt. Dann wurde die Nanosuspension in Fläschchen gefüllt, bei –35 °C gefroren und gefriergetrocknet.

[0060] Lipidverbindungen wie Cetylphosphat, Kaliumcholesterinsulfat oder Tocopherolsuccinat wurden in einigen Zubereitungen als Emulgatoren und/oder Gegenionen verwendet. In diesem Falle wurde das Polymer und die Lipid-Komponente in dem organischen Lösemittel (Dichlormethan oder Chloroform) und der Wirkstoff in Wasser gelöst. Die organische und die wässrige Lösung wurden miteinander gemischt und bei Raumtemperatur 12 h lang inkubiert. Dann wurde die Mischung in eine gerührte wässrige Lösung (25 ml) gegossen, welche einen Stabilisator enthielt, und dann wie oben beschrieben weiter behandelt.

[0061] Für das Doppelemulsionsverfahren wurde das Polymer (500 mg) üblicherweise in Dichlormethan (5 ml) (1 h unter Rühren mit einem Magnetrührer) gelöst. Der Wirkstoff (50 mg) wurde in Wasser (2 ml) gelöst. Die wässrige Lösung wurde tropfenweise zu der organischen Phase hinzugegeben. Die Mischung wurde unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min bei 19.500 U/min) emulgiert. Die erhaltene WÖ-Emulsion wurde zu 25 ml einer 1%igen wässrigen Lösung eines Stabilisators (PVA, HSA oder TGPS) und dann unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 emulgiert. Die erhaltene grobe Emulsion wurde dann durch einen Hochdruck-Homogenisator (APV Micron Lab 40) bei einem Druck von 600 bar geleitet. Der Homogenisierungsschritt wurde mehrfach wiederholt, um stabile WÖW-Emulsionen zu erhalten. Das organische Lösemittel wurde aus der WÖW-Emulsion durch langsames Verdampfen bei Raumtemperatur unter normalem Druck (Magnetrührer, 3h) entfernt. Die erhaltene Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert, und 5 % (Gew./vol.). Mannitol wurden als Gefrierschutzmittel hinzugefügt. Anschließend wurde die Emulsion in Fläschchen (1 ml/Fläschchen) gefüllt, eingefroren (–35 °C) und gefriergetrocknet.

[0062] Dichlormethan ist ein bei der Herstellung von PLA/PLGA-Nanopartikeln typischer Weise verwendetes

Lösemittel. Es ist jedoch auch möglich, Ethylacetat oder Mischungen aus Dichlormethan und Ethylacetat zu verwenden. Allerdings sind bestimmte Gegenionen nicht in Ethylacetat löslich. In diesen Fällen ist Ethylacetat kein geeignetes Lösemittel für die Herstellung von PLA/PLGA-Nanopartikeln.

[0063] Die erhaltenen Formulierungen wurden auf Resuspendierbarkeit, Partikelgröße, Wirkstoffbeladung (theoretisch) und Wirkstoffgehalt untersucht.

[0064] Die erhaltene nanopartikuläre Formulierung wurde als geeignet erachtet, wenn nach der Rekonstituierung der gefriergetrockneten Nanopartikel mit Wasser ein einheitliches und stabiles kolloidales System festgestellt wurde. Die Resuspendierbarkeit der Nanopartikel wurde visuell bewertet. Daher wurde der Inhalt einer eine gefriergetrocknete Formulierung enthaltenen Fläschchen bis zum anfänglichen Volumen (2 ml) mit Wasser rekonstituiert und die Fläschchen 2–4 min lang leicht geschüttelt. Geeignete rekonstituierte Formulierungen werden zu opaleszenten Flüssigkeiten ohne sichtbare Agglomerate oder Präzipitate. Proben, die sichtbare Agglomerate oder Präzipitate enthielten, wurden verworfen.

[0065] Die Größenbestimmung der Nanopartikel erfolgte durch Photo nenkorrelationsspektroskopie (PCS), wobei ein Aliquot der rekonstituierten Formulierungen (50 µl) in ein Nanosizer-Röhrchen, das 3 ml doppelt destilliertes Wasser enthielt, transferiert wurde. Das Röhrchen wurde geschüttelt und dann in einen Coulter N4MD Nanosizer (Coulter Electronics, UK) eingeführt. Die Arbeitsparameter waren wie folgt:

Streuungswinkel:	90°
Temperatur:	25°
Viskosität:	0,01 Poise
Brechungsindex:	1,333

[0066] Die Wirkstoffbeladung wurde entweder nach dem Filtrationsschritt in der Reaktionsmischung oder nach der Rekonstitu tion in der gefriergetrockneten Formulierung bestimmt. Das Verfahren zur Bestimmung der Wirkstoffbeladung umfasst die Trennung der Nanopartikel durch Ultrafiltration und die anschließende quantitative Analyse eines freien Wirkstoffs im Filtrat durch Spektrophotometrie.

[0067] Zur Bestimmung der Wirkstoffbeladung einer Nanopartikel- Formulierung wurde der Inhalt eines Fläschchens, das eine gefriergetrocknete Formulierung enthielt, in 1 ml Wasser rekonstituiert; 400 µl wurden in einen Mikrozentrifugenfilter (Microcon 30 kDa, Millipore) transferiert und die Nanopartikel durch Zentrifugieren bei 16.000 U/min für 50 min abgetrennt. 100 µl des klaren Filtrats wurden in eine Küvette, die 3 ml doppelt destilliertes Wasser enthielt, transferiert, und die Absorption wurde unter Verwendung eines Spektrophotometers (Spectronics Heλios, Thermospectronic, GB) gegen Wasser bei 480 nm gemessen. Die Konzentration eines Wirkstoffs in der Probe wurde unter Verwendung einer geeigneten Kalibrierungskurve bestimmt.

[0068] Die relative Wirkstoffbeladung (% der Gesamtwirkstoffmenge) wurde wie folgt berechnet:

$$\%\ \textit{Wirkstoffbeladung} = \frac{Ci - Cf}{Ci} \times 100\%$$

, wobei

C_i = anfängliche Wirkstoffkonzentration im Polymerisationsmedium (mg/ml);
C_f = Wirkstoffkonzentration im Filtrat (mg/ml).

[0069] Das Verfahren zur Bestimmung des Wirkstoffgehalts (mg/Fläschchen) ist eine quantitative Analyse nach vollständiger Lösung der gefriergetrockneten Formulierung. Die Konzentration des in Lösung befindlichen Wirkstoffs wird durch Spektrophotometrie unter Verwendung einer Kalibrierungskurve gemessen.

[0070] Zur Bestimmung des Wirkstoffgehalts wurde der Inhalt eines Fläschchens mit einer gefriergetrockneten Formulierung in 2 ml Dimethylsulfoxid)(3 h, Raumtemperatur) gelöst; 100 µl dieser Lösung wurden in eine Spektrophotometer-Küvette, die 3 ml doppelt destilliertes Wasser enthielt, transferiert, und die Absorption wurde bei 480 nm gegen Wasser, unter Verwendung eines Spektrophotometers (Spectronics Heλios; Thermospectronic, GB) gemessen. Die Konzentration eines Wirkstoffs in der Probe wurde unter Verwendung der geeigneten Kalibrierungskurve bestimmt.

Zubereitung 1

[0071] Nanopartikel wurden durch ein Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahren hergestellt. 250 mg des Polymers (PLGA 75:25, MW 90.000–126,000 Da) und 25 mg Doxorubicin wurden in 5 ml Dichlormethan gelöst. Die organische Phase wurde in eine gerührte wässrige Lösung (25 ml), die 0,5 % PVA als Stabilisator enthielt, gegossen und die Mischung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 15.100 U/min) emulgiert. Die resultierende primäre Emulsion wurde unter Verwendung eines Hochdruckhomogenisators (APV Micron Lab 40) bei 400 bar weiter homogenisiert. Dichlormethan wurde unter vermindertem Druck (Rotationsverdampfer BUCHI R-200) verdampft. Die resultierende Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die durch PCS bestimmte Partikelgröße betrug 140–220 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 40 %.

Zubereitung 2

[0072] Nanopartikel wurden durch ein Doppelemulsionsverfahren hergestellt. 500 mg eines Polymers (PLGA mit Säure-Endgruppen, logarithmische Viskositätszahl: η = 0,20 dL/g) wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst. 25 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml 0,001N HCl gelöst. Die wässrige Lösung wurde in die organische Phase gegossen und die Mischung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 19.500 U/min) emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wurde in 25 ml einer wässrigen 1%igen PVA-Lösung gegossen und die Mischung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 erneut homogenisiert; es folgte ein dreimaliger Durchlauf durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde durch Rühren der Emulsion bei Raumtemperatur für 3h verdampft. Die erhaltene Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 (Gew./Vol.). Mannitol als Gefrierschutzmittel, gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die Partikelgröße wurde durch PCS bestimmt und betrug 110–160 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 75 %.

Zubereitung 3

[0073] Nanopartikel wurden durch ein Doppelemulsionsverfahren hergestellt. 500 mg des Polymers (PLGA 75:25, MG 90.000–126.000 Da) wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst. 25 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml 0,001N HCl gelöst. Die wässrige Lösung wurde in die organische Phase gegossen und die Mischung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 19.500 U/min) emulgiert. Die resultierende primäre Emulsion wurde in 25 ml einer wässrigen 1%igen PVA-Lösung gegossen, diese Lösung wurde unter Verwendung des Ultra-Turrax T-25 erneut homogenisiert; anschließend folgten vier Durchläufe durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde durch Rühren der Emulsion bei Raumtemperatur für 3 h verdampft. Die resultierende Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel, gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die durch PCS bestimmte Partikelgröße betrug 160–330 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 47 %.

Zubereitung 4

[0074] Nanopartikel wurden durch ein Doppelemulsionsverfahren hergestellt. 500 mg des Polymers (PLA, η = 0,36 dL/g) wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst. 25 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml 0,001N HCl gelöst. Die wässrige Lösung wurde in die organische Phase gegossen; die Mischung wurde unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 19.500 U/min) emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wurde in 25 ml einer wässrigen 1%igen PVA-Lösung gegossen und die Mischung unter Verwendung des Ultra-Turrax T-25 erneut homogenisiert; anschließend folgten vier Durchläufe durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde durch Rühren der Emulsion bei Raumtemperatur für 3 h verdampft. Die resultierende Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die durch PCS bestimmte Partikelgröße betrug 126–210 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 42 %.

Zubereitung 5

[0075] Nanopartikel wurden durch ein Doppelemulsionsverfahren hergestellt. 500 mg des Polymers (PLGA mit Säure-Endgruppen, η = 0,20 dL/g) wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst. 25 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml 0,001N HCl gelöst. Die wässrige Lösung wurde in die organische Phase gegossen und die Mi-

schung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 19.500 U/min) emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wurde in 25 ml einer wässrigen 1%igen PVA-Lösung gegossen und die Mischung unter Verwendung des Ultra-Turrax T-25 erneut homogenisiert; es folgte ein dreimaliger Durchlauf durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde durch Rühren der Emulsion bei Raumtemperatur für 3h verdampft. Die erhaltene Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel, gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die Partikelgröße wurde durch PCS bestimmt und betrug 140–200 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 73 %.

Zubereitung 6

[0076] Nanopartikel wurden durch ein Doppelemulsionsverfahren hergestellt. 500 mg des Polymers (PLGA 50:50 mit Säure-Endgruppen, η = 0,20 dL/g) wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst. 25 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml 0,001N HCl gelöst. Die wässrige Lösung wurde in die organische Phase gegossen und die Mischung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 19.500 U/min) emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wurde in 25 ml einer wässrigen 1%igen PVA-Lösung gegossen und die Mischung unter Verwendung des Ultra-Turrax T-25 erneut homogenisiert; es folgte ein dreimaliger Durchlauf durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde durch Rühren der Emulsion bei Raumtemperatur für 3h verdampft. Die erhaltene Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel, gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die Partikelgröße wurde durch PCS bestimmt und betrug 130–190 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 67 %.

Zubereitung 7

[0077] Nanopartikel wurden durch ein Doppelemulsionsverfahren hergestellt. 500 mg des Polymers (PLGA 50:50 mit Säure-Endgruppen, η = 0,20 dL/g) wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst. 50 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml 0,001N HCl gelöst. Die wässrige Lösung wurde in die organische Phase gegossen und die Mischung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 20.100 U/min) emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wurde in 25 ml einer wässrigen 1%igen PVA-Lösung gegossen und die Mischung unter Verwendung des Ultra-Turrax T-25 erneut homogenisiert; es folgte ein viermaliger Durchlauf durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde durch Rühren der Emulsion bei Raumtemperatur für 3h verdampft. Die erhaltene Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel, gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die Partikelgröße wurde durch PCS bestimmt und betrug 125–185 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 69 %.

Zubereitung 8

[0078] Nanopartikel wurden durch ein Doppelemulsionsverfahren hergestellt. 500 mg des Polymers (PLGA 50:50 mit Säure-Endgruppen, η = 0,20 dL/g) wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst. 25 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml 0,001N HCl gelöst. Die wässrige Lösung wurde in die organische Phase gegossen und die Mischung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 22.600 U/min) emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wurde in 25 ml einer wässrigen 1%igen HSA-Lösung gegossen und die Mischung unter Verwendung des Ultra-Turrax T-25 erneut homogenisiert; es folgte ein viermaliger Durchlauf durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde durch Rühren der Emulsion bei Raumtemperatur für 3h verdampft. Die erhaltene Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel, gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die Partikelgröße wurde durch PCS bestimmt und betrug 100–200 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 40 %.

Zubereitung 9

[0079] Nanopartikel wurden durch ein Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahren hergestellt. 250 mg des Polymers (PLA, MG 90.000 – 126.000 Da) und 15.1 mg Cetylphosphat wurden in 4 ml Dichlormethan gelöst. 21,8 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml Wasser gelöst. Die organische und die wässrige Lösung wurden miteinander gemischt und 12 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in eine gerührte wässrige Lösung (25 ml), die 1 % HSA als Stabilisator enthielt, gegossen und unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 19.100 U/min) emulgiert. Anschließend folgte ein viermaliger Durchlauf der resultierenden primären Emulsion durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron

Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde unter vermindertem Druck (Rotationsverdampfer BUCHI R-200) verdampft. Die resultierende Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel, gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die durch PCS bestimmte Partikelgröße betrug 160–240 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 60 %.

Zubereitung 10

[0080] Nanopartikel wurden durch ein Doppelemulsionsverfahren hergestellt. 500 mg des Polymers (PLGA 50:50 mit Säure-Endgruppen, η = 0,20 dL/g) wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst. 25 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml 0,001N HCl gelöst. Die wässrige Lösung wurde in die organische Phase gegossen und die Mischung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 19.900 U/min) emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wurde in 25 ml einer wässrigen 1%igen TGPS-Lösung gegossen und die Mischung unter Verwendung des Ultra-Turrax T-25 erneut homogenisiert; es folgte ein viermaliger Durchlauf durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde durch Rühren der Emulsion bei Raumtemperatur für 3h verdampft. Die erhaltene Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 % (Gew./vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel, gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die Partikelgröße wurde durch PCS bestimmt und betrug 300–380 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 45 %.

Zubereitung 11

[0081] Nanopartikel wurden durch ein Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahren hergestellt. 250 mg des Polymers (PLA, 0,34 dL/g) und 21,2 mg Kaliumcholesterinsulfat wurden in 5 ml Chloroform gelöst. 21,8 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml Wasser gelöst. Die organische und die wässrige Lösung wurden miteinander gemischt und 12 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in eine gerührte wässrige Lösung (23 ml), die 1 % PVA als Stabilisator enthielt, gegossen und unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 19.100 U/min) emulgiert. Anschließend folgte ein viermaliger Durchlauf der resultierenden primären Emulsion durch einen Hochdruckhomogenisator (APv Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde unter vermindertem Druck (Rotationsverdampfer BUCHI R-200) verdampft. Die resultierende Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die durch PCS bestimmte Partikelgröße betrug 500–600 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 89 %.

Zubereitung 12

[0082] Nanopartikel wurden durch ein Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahren hergestellt. 250 mg des Polymers (PLA, 0,34 dL/g) und 22,9 mg D-α-Tocopherolsuccinat wurden in 5 ml Chloroform gelöst. 25,4 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml Wasser gelöst. Die organische und die wässrige Lösung wurden miteinander gemischt und 12 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in eine gerührte wässrige Lösung (23 ml), die 0,5 % PVA als Stabilisator enthielt, eingerührt und unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 23.600 U/min) emulgiert. Es folgte ein viermaliger Durchlauf der resultierenden primären Emulsion durch einen Hochdruckhomogenisator (APv Micron Lab 40) bei 600 bar. Chloroform wurde unter vermindertem Druck (Rotationsverdampfer BUCHI R-200) verdampft. Die resultierende Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die durch PCS bestimmte Partikelgröße betrug 224–368 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 50 %.

Zubereitung 13

[0083] Nanopartikel wurden durch ein Hochdruckhomogenisierungs-Lösemittelverdampfungs-Verfahren hergestellt. 250 mg des Polymers (PLA, 0,34 dL/g) und 14,9 mg Cetylphosphat wurden in 5 ml Chloroform gelöst. 24,5 mg Doxorubicinhydrochlorid wurden in 2 ml Wasser gelöst. Die organische und die wässrige Phase wurden miteinander gemischt und 12 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in eine gerührte wässrige Lösung (23 ml), die 0,5 % PVA als Stabilisator enthielt, gegossen und unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 23.600 U/min) emulgiert. Dann folgte ein viermaliger Durchlauf der resultierenden primären Emulsion durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Chloroform wurde unter vermindertem Druck (Rotationsverdampfer BUCHI R-200) verdampft. Die resultierende Na-

nosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die durch PCS bestimmte Partikelgröße betrug 200–250 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 53 %.

Zubereitung 14

[0084] Nanopartikel wurden durch ein Doppelemulsionsverfahren hergestellt. 500 mg des Polymers (PLGA 50:50 mit Säure-Endgruppen, η = 0,67 dL/g) wurden in 3 ml Dichlormethan gelöst. 20 mg Doxorubicinhydrochlorid und 45 mg γ-Cyclodextrin wurden in 3 ml Wasser gelöst. Eine wässrige Lösung wurde in die organische Phase gegossen; die Mischung wurde unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 (2 min; 23.600 (U/min) emulgiert. Die erhaltene primäre Emulsion wurde in 25 ml einer wässrigen 0,5%igen PVA-Lösung gegossen und die Mischung unter Verwendung eines Ultra-Turrax T-25 erneut homogenisiert; anschließend folgten vier Durchläufe durch einen Hochdruckhomogenisator (APV Micron Lab 40) bei 600 bar. Dichlormethan wurde durch Rühren der Emulsion bei Raumtemperatur für 3 h verdampft. Die resultierende Nanosuspension wurde durch einen gesinterten Glasfilter gefiltert und, nach Zugabe von 5 % (Gew./Vol.) Mannitol als Gefrierschutzmittel, gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Formulierung war vollständig resuspendierbar. Die durch PCS bestimmte Partikelgröße betrug 200–250 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 44 %.

2. Tierstudien

[0085] Modell-System mit orthotopem Tumor. Ein experimentelles System basierte auf einem intrakranial in Ratten implantierten 101/8-Glioblastom. Dieser Tumor wurde zunächst durch lokale Injektion eines α-Dimethylbenzanthracen(DMBA)-Pellets in das Cerebellum einer Wistar-Ratte erzeugt und durch kontinuierliche Passagen mittels intracerebraler Implantation erhalten. Für die langfristige Lagerung wurde das Tumorgewebe bei –196 °C gelagert und durch Injektion in die Gehirne der Ratten propagiert.

[0086] Das 101/8-Glioblastom wurde früher für die experimentelle Chemotherapie mit Doxorubicin verwendet, wobei die oberflächenmodifizierten Poly(butylcyanoacrylatnanopartikel) mit letzterem beladen waren. Der Tumor hat eine stabile monomorphe Struktur und zeigt das charakteristische histologische Bild aggressiver Glioblastome mit schnellem diffusem Wachstum im Hirnparenchym und einer recht geringen Tendenz zur Nekrose. Die Transplantierbarkeit des Tumors betrug etwa 100 % und ergab eine vorhersagbare symptomfreie Lebensspanne nach der Inokulation. Die Transplantation des 101/8-Glioblastoms erfolgte in der vorliegenden Studie unter Anwendung frischen Tumorgewebes. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um die typischen Hauptmerkmale des Stammtumors, insbesondere dessen antigene Struktur und Differentierung, zu erhalten.

[0087] Adulte männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200–250 g wurden 1 Woche lang akklimatisiert und in Gruppen von 5 Ratten in Käfigen untergebracht. Die Ratten erhielten Standard-Laborfutter und Wasser ad libitum. Für die Tumorimplantation wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektionen mit Pentobarbital (50 mg/kg) tief narkotisiert. Durch einen mediosagittalen Einschnitt wurde mit einem Dentalbohrer ein Bohrloch von 1,5 mm Durchmesser an einem 2 mm hinter der rechten Sutura coronalis und 2 mm seitlich der sagittalen Mittellinie gelegenen Punkt erzeugt. Tumormaterial (ungefähr 10^6 Zellen) aus dem gefrorenen Vorrat wurden auf eine Tuberkulinspritze aufgezogen, die mit einer 21 G-Kanüle verbunden war. Die Spitze der Kanüle wurde 4 mm unterhalb der Knochenfläche platziert und das Tumorgewebe in den Grund des rechten Seitenventrikels injiziert. Der Schädelschnitt wurde vernäht oder mit Kleber geschlossen. Nach Entwicklung deutlicher klinischer Symptome der Krankheit (gewöhnlich etwa am 14. Tag) wurden die Tiere durch Kohlendioxid-Asphyxiation getötet und dann dekapitiert. Das Gehirn wurde unmittelbar danach entfernt. Der Tumor wurde exzidiert und mit einem Skalpell zerkleinert; ein Tumorimplantat (5 mg) wurde in das Gehirn neuer Versuchstiere, wie oben beschrieben, inokuliert. Die entsprechenden Koordinaten wurden bestätigt und das Verfahren durch wiederholte Pilotversuche verfeinert.

[0088] Die für die Tierversuche zu verwendenden Nanopartikel wurden auf Basis von niedermolekularem PLGA 50:50 mit Säure-Endgruppen (η = 0,20 dl/g) hergestellt und mit Doxorubicin beladen, wobei Doxorubicinhydrochlorid verwendet wurde. Für die Herstellung der mit Doxorubicin beladenen PLGA-Nanopartikel wurde ein Verhältnis von Wirkstoff zu Polymer von 1:10 verwendet. Die Partikelgröße wurde bestimmt und betrug 144 ± 12 nm, die Doxorubicin-Beladung betrug 75,5 %.

[0089] Um mit einem oberflächenaktiven Stoff beschichtete Partikel zu erhalten, wurde die gefriergetrocknete Formulierung in einer wässrigen 1%igen Lösung der jeweiligen oberflächenaktiven Substanz (Pluronic® F68, Pluronic® P85 und Polysorbat 80) resuspendiert. Die erhaltenen Zubereitungen wurden dann 30 min lang unter Rühren inkubiert und innerhalb von 2 h verwendet.

[0090] Tumor-tragende Ratten wurden nach dem Zufallsprinzip in sechs Gruppen (n = 10) aufgeteilt und erhielten eine der folgenden Formulierungen: 1) unbehandelte Kontrolle; 2) Doxorubicin in Salzlösung (DOX); 3) Doxorubicin in 1%iger Pluronic® F68-Lösung (Dox/F68); 4) mit Doxorubicin beladene PLGA-Nanopartikel (DOX-PLGA); 5) mit Doxorubicin beladene PLGA-Nanopartikel mit einem Überzug aus Pluronic® F68 (DOX-PLGA/F68); 6) mit Doxorubicin beladene PLGA-Nanopartikel mit einem Überzug aus Polysorbat 80 (nicht gezeigt); 7) mit Doxorubicin beladene PLGA-Nanopartikel mit einem Überzug aus Pluronic® F85 (Ergebnisse in Fig. 1 nicht dargestellt).

[0091] Diese Zubereitungen wurden intravenös in die Schwanzvene injiziert, und zwar nach dem Regime: 3 × 1,5 mg/kg am Tag 2, Tag 5 und Tag 8 nach Tumorimplantation.

[0092] Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 100 Tagen nach der Behandlung beobachtet; Tiere, die bis zu diesem Zeitpunkt überlebt hatten, wurden getötet und autopsiert. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt.

[0093] In der Kontrollgruppe starben alle Tiere innerhalb von 19 Tagen nach der Tumorimplantation. Die mit Doxorubicin beladenen und mit Poloxamer 188 beschichteten PLGA-Nanopartikel verbesserten die Überlebensrate der tumortragenden Ratten erheblich: 40 % der Tiere (4/10) überlebten über einen Zeitraum von 100 Tagen. Lediglich ein Tier der mit Doxorubicin in einer 1%igen Lösung von Poloxamer 188 behandelten Gruppe überlebte. Das Nichtvorliegen eines Tumors wurde bei diesen Tieren durch morphologische Untersuchung bestätigt.

[0094] Im Gegensatz zu den Resultaten, die mit den mit Doxorubicin beladenen und mit Poloxamer 188 überzogenen PLGA-Nanopartikeln erhalten wurden, führte das Überziehen der mit Doxorubicin beladenen Nanopartikel mit Polysorbat 80 oder Pluronic® P85 zu keiner Verbesserung der Wirksamkeit des an die Nanopartikel gebundenen Doxorubicins (Daten nicht dargestellt).

[0095] In einer zweiten Versuchsreihe wurden Formulierungen, die mit Doxorubicin beladene PLGA-Nanopartikel auf Basis von PLGA mit Säure-Endgruppen (PLGA-COOH) umfassten und TPGS als Stabilisator enthielten (Dox/PLGA-COOH/TPGS; Zubereitung 10) oder mit TPGS beschichtet waren (Dox/PLGA-COOH + TPGS), auf ihre in-vivo-Wirkung bei ein 101/8-Glioblastom tragenden Ratten untersucht. Letztere Formulierung wurde durch Resuspendieren von Nanopartikeln gemäß Zubereitung 5 in 0,5 % TPGS erhalten, bevor die Nanopartikel in die Tiere injiziert wurden.

[0096] Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Fig. 2 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Nanopartikel gemäß Zubereitung 10, d.h. Nanopartikel, die TPGS als Stabilisator enthielten, zu einer erheblichen Steigerung der überlebenszeitspanne tumortragender Ratten führte und ein langfristiges Überleben von 20 % der für dieses Experiment verwendeten tumortragenden Ratten erlaubte. Nanopartikel gemäß Zubereitung 5, welche vor deren Verwendung mit TPGS überzogen wurden, zeigten keine Wirkung.

Patentansprüche

1. System zur gezielten Wirkstoffzufuhr zur Verabreichung eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffes an das zentrale Nervensystem eines Säugers über die Blut-Hirn-Schranke, wobei das System zur gezielten Arzneistoffzufuhr Nanopartikel aus Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-co-glycolid und wenigstens einen pharmakologisch wirksamen Wirkstoff umfasst, der in den Nanopartikeln absorbiert, an diese adsorbiert und/oder in diese eingearbeitet. ist, und wobei das System TPGS enthält oder einen Überzug auf dem oberflächenaktiven Stoff Pluronic 188 aufweist, der auf den mit Wirkstoff beladenen Nanopartikeln abgeschieden ist.

2. System zur gezielten Wirkstoffzufuhr nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 1000 nm, vorzugsweise zwischen 100 und 800 nm und mit größtem Vorzug zwischen 150 und 600 nm umfassen.

3. System zur gezielten Wirkstoffzufuhr nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem pharmakologisch wirksamen Wirkstoff um ein Therapeutikum oder ein Diagnostikum handelt.

4. System zur gezielten Wirkstoffzufuhr nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Therapeutikum ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wirkstoffen, die an synaptischen und Neuroeffektor-Knotenpunkten wirken; allgemeinen und lokalen Analgetika und Anästhetika; Hypnotika und Sedativa; Wirkstoffen für die Behandlung psychiatrischer Störungen wie beispielsweise Depressionen und Schizophrenie; Antiepi-

leptika und Antikonvulsiva; Wirkstoffen zur Behandlung der Huntington-Krankheit, des Alterns und der Alzheimer-Krankheit; exzitatorischen Aminosäure-Antagonisten und neurotropen Faktoren und neurogenerativen Mitteln; trophischen Faktoren; Wirkstoffen, die zur Behandlung von Traumata des zentralen Nervensystems oder Schlaganfällen vorgesehen sind; Wirkstoffen zur Behandlung von Sucht und Drogenmissbrauch; autakoiden und entzündungshemmenden Wirkstoffen; chemotherapeutischen Mitteln für Parasiten-Infektionen und mikrobiell bedingte Krankheiten; immunosuppressiven Mitteln und Antikrebs-Mitteln; Hormonen und Hormon-Antagonisten; Schwermetallen und Schwermetall-Antagonisten; Antagonisten für nichtmetallische toxische Mittel; zytostatischen Mitteln zur Behandlung von Krebs; diagnostischen Substanzen zur Verwendung in der Nuklearmedizin; immunoaktiven und immunoreaktiven Mitteln; Transmittern und ihren jeweiligen Rezeptor-Agonisten und Rezeptor-Antagonisten, ihren entsprechenden Vorläufern oder Metaboliten; Antibiotika, Antispasmodika, Antihistaminen, Mittel gegen Nausea, Relaxantien, Stimulantia, "Sense-" und "Anti-Sense-"Oligonukleotiden, Cerebral-Dilatatoren, Psychotropika, gegen Manie gerichtete Mittel, gefäßerweiternde und -verengende Mittel, Antihypertensiva, Mittel zur Migräne-Behandlung, Hypnotika, hyperglykämische oder hypoglykämische Mittel, mineralische oder der Ernährung dienende Mittel, gegen Fettleibigkeit gerichtete Mittel, Anabolika und Antiasthmatika sowie Mischungen daraus.

5. System zur gezielten Wirkstoffzufuhr nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Antikrebs-Mittel um ein antineoplastisches Mittel handelt, welches ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Alkaloiden, alkylierenden Mitteln wie Alkylsulfonaten, Aziridinen, Ethyleniminen und Methylmelaminen, Stickstofflosten, Nitrosoharnstoffen, Antibiotika und Analoges, vorzugsweise Anthracyclinen, Antimetaboliten wie Analoges der Folsäure, Antagonisten der Folsäure, Purin-Analoga und Pyrimidin-Analoga, Enzymen, Immunmodulatoren, Immuntoxinen, monoklonalen Antikörpern und Platinkomplexen.

6. System zur gezielten Wirkstoffzufuhr nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Diagnostikum nützlich bei der Diagnose in der Nuklearmedizin und/oder der Strahlentherapie ist.

7. Verfahren zur Herstellung eines Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr zur Verabreichung eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffes an das zentrale Nervensystem eines Säugers über die Blut-Hirn-Schranke, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
– Lösen von Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid) sowie wenigstens eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffs und wahlweise einer Lipid-Verbindung in einem organischen Lösemittel, um eine organische Phase zu erhalten;
– Gießen der organischen Phase in eine wässrige Lösung, die TPGS enthält;
– Emulgieren der Mischung, um eine primäre Emulsion zu erhalten;
– Homogenisieren der primären Emulsion;
– Entfernen des organischen Lösemittels aus der primären Emulsion; und
– Filtern der resultierenden Nanosuspension, welche mit Wirkstoff beladene Nanopartikel enthält.

8. Verfahren zur Herstellung eines Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr zur Verabreichung eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffes an das zentrale Nervensystem eines Säugers über die Blut-Hirn-Schranke, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
– Lösen von Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid) sowie wenigstens eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffs und wahlweise einer Lipid-Verbindung in einem organischen Lösemittel, um eine organische Phase zu erhalten;
– Gießen der organischen Phase in eine wässrige Lösung, die wahlweise ein Stabilisierungsmittel enthält;
– Emulgieren der Mischung, um eine primäre Emulsion zu erhalten;
– Homogenisieren der primären Emulsion;
– Entfernen des organischen Lösemittels aus der primären Emulsion;
– Filtern der resultierenden Nanosuspension, welche mit Wirkstoff beladene Nanopartikel enthält; und
– Überziehen der Nanopartikel mit Poloxamer 188.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipid-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Cetylphosphat, Kaliumcholesterinsulfat und Tocopherolsuccinat.

10. Verfahren zur Herstellung eines Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr zur Verabreichung eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffes an das zentrale Nervensystem eines Säugers über die Blut-Hirn-Schranke, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
– Lösen von Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid) in einem organischen Lösemittel, um eine organische Phase zu erhalten;
– Lösen wenigstens eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffs in einer wässrigen Lösung;

– Gießen der wässrigen Lösung in die organische Phase;
– Emulgieren der Mischung, um eine primäre Emulsion zu erhalten;
– Gießen der primären Emulsion in eine wässrige TPGS-Lösung;
– Homogenisieren der Mischung aus primärer Emulsion und wässriger TPGS-Lösung;
– Entfernen des organischen Lösemittels aus der Mischung aus primärer Emulsion und wässriger Lösung eines Stabilisators; und
– Filtern der resultierenden Nanosuspension, welche mit Wirkstoff beladene Nanopartikel enthält.

11. Verfahren zur Herstellung eines Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr zur Verabreichung eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffes an das zentrale Nervensystem eines Säugers über die Blut-Hirn-Schranke, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
– Lösen von Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid) in einem organischen Lösemittel, um eine organische Phase zu erhalten;
– Lösen wenigstens eines pharmakologisch wirksamen Wirkstoffs in einer wässrigen Lösung;
– Gießen der wässrigen Lösung in die organische Phase;
– Emulgieren der Mischung, um eine primäre Emulsion zu erhalten;
– Gießen der primären Emulsion in eine wässrige Lösung eines Stabilisierungsmittels;
– Homogenisieren der Mischung aus primärer Emulsion und wässriger Lösung eines Stabilisierungsmittels;
– Entfernen des organischen Lösemittels aus der Mischung aus primärer Emulsion und wässriger Lösung eines Stabilisierungsmittels;
– Filtern der resultierenden Nanosuspension, welche mit Wirkstoff beladene Nanopartikel enthält, und
– Überziehen der Nanopartikel mit Poloxamer 188.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Stabilisierungsmittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Polyvinylalkoholen, Serumalbumin, TPGS und γ-Cyclodextrin.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Polyvinylalkohol ein Molekulargewicht von 30–70 kDa aufweist.

14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Serumalbumin humanes Serumalbumin ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der pharmakologisch wirksame Wirkstoff ein Therapeutikum oder ein Diagnostikum ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Therapeutikum ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wirkstoffen, die an synaptischen und Neuroeffektor-Knotenpunkten wirken; allgemeinen und lokalen Analgetika und Anästhetika; Hypnotika und Sedativa; Wirkstoffen für die Behandlung psychiatrischer Störungen wie beispielsweise Depressionen und Schizophrenie; Antiepileptika und Antikonvulsiva; Wirkstoffen zur Behandlung der Huntington-Krankheit, des Alterns und der Alzheimer-Krankheit; exzitatorischen Aminosäure-Antagonisten und neurotropen Faktoren und neurogenerativen Mitteln; trophischen Faktoren; Wirkstoffen, die zur Behandlung von Traumata des zentralen Nervensystems oder Schlaganfällen vorgesehen sind; Wirkstoffen zur Behandlung von Sucht und Drogenmissbrauch; autakoiden und entzündungshemmenden Wirkstoffen; chemotherapeutischen Mitteln für Parasiten-Infektionen und mikrobiell bedingte Krankheiten; immunosuppressiven Mitteln und Antikrebs-Mitteln; Hormonen und Hormon-Antagonisten; Schwermetallen und Schweranetall-Antagonisten; Antagonisten für nichtmetallische toxische Mittel; zytostatischen Mitteln zur Behandlung von Krebs; diagnostischen Substanzen zur Verwendung in der Nuklearmedizin; immunoaktiven und immunoreaktiven Mitteln; Transmittern und ihren jeweiligen Rezeptor-Agonisten und Rezeptor-Antagonisten, ihren entsprechenden Vorläufern oder Metaboliten; Antibiotika, Antispasmodika, Antihistaminen, Mitteln gegen Nausea, Relaxantien, Stimulantia "Sense" und "Anti-Sense-"Oligonukleotiden, Cerebral-Dilatatoren, Psychotropika, gegen Manie gerichtete Mittel, gefäßerweiternde und -verengende Mittel, Antihypertensiva, Mittel zur Migräne-Behandlung, Hypnotika, hyperglykämische oder hypoglykämische Mittel, mineralische oder der Ernährung dienende Mittel, gegen Fettleibigkeit gerichtete Mittel, Anabolika und Antiasthmatika sowie Mischungen daraus.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Antikrebs-Mittel um ein antineoplastisches Mittel handelt, welches ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Alkaloiden, alkylierenden Mitteln wie Alkylsulfonaten, Aziridinen, Ethyleniminen und Methylmelaminen, Stickstofflosten, Nitrosoharnstoffen, Antibiotika und Analoga, vorzugsweise Anthracyclinen, Antimetaboliten wie Analoga der Folsäure, Antagonisten der Folsäure, Purin-Analoga und Pyrimidin-Analoga, Enzymen, Immunmodulatoren, Immuntoxi-

nen, monoklonalen Antikörpern und Platinkomplexen.

18. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Diagnostikum nützlich bei der Diagnose in der Nuklearmedizin und/oder der Strahlentherapie ist.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das organische Lösemittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Dichlormethan, Chloroform, Ethylacetat und Mischungen daraus.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanosuspension nach Zugabe eines Gefrierschutzmittels gefriergetrocknet wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Gefrierschutzmittel Mannitol ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Gefrierschutzmittel in einer Menge von 5 % (Gew./Vol.) zu der Nanosuspension hinzugegeben wird.

23. Verfahren zur Behandlung einer Krankheit oder einer Störung des zentralen Nervensystems eines Säugers, umfassend die Schritte:
– Herstellen von mit Wirkstoff beladenen Nanopartikeln aus Poly(DL-lactid) und/oder Poly(DL-lactid-coglycolid);
– Überziehen der mit Wirkstoff beladenen PLGA-Nanopartikel mit Poloxamer 188;
– Verabreichen der wirkstoffbeladenen, mit Poloxamer 188 überzogenen Nanopartikel an den Blutkreislauf eines Säugers; und
– den Wirkstoff zur Wirkung kommen lassen, so dass er seine pharmakologische Wirkung entfalten kann.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt der Verabreichung die orale oder intravenöse Verabreichung umfasst.

25. Verwendung des Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Behandlung einer Krankheit oder einer Störung des zentralen Nervensystems eines Säugers.

26. Verwendung des Systems zur gezielten Wirkstoffzufuhr nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung einer Krankheit oder einer Störung des zentralen Nervensystems, eines Säugers.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

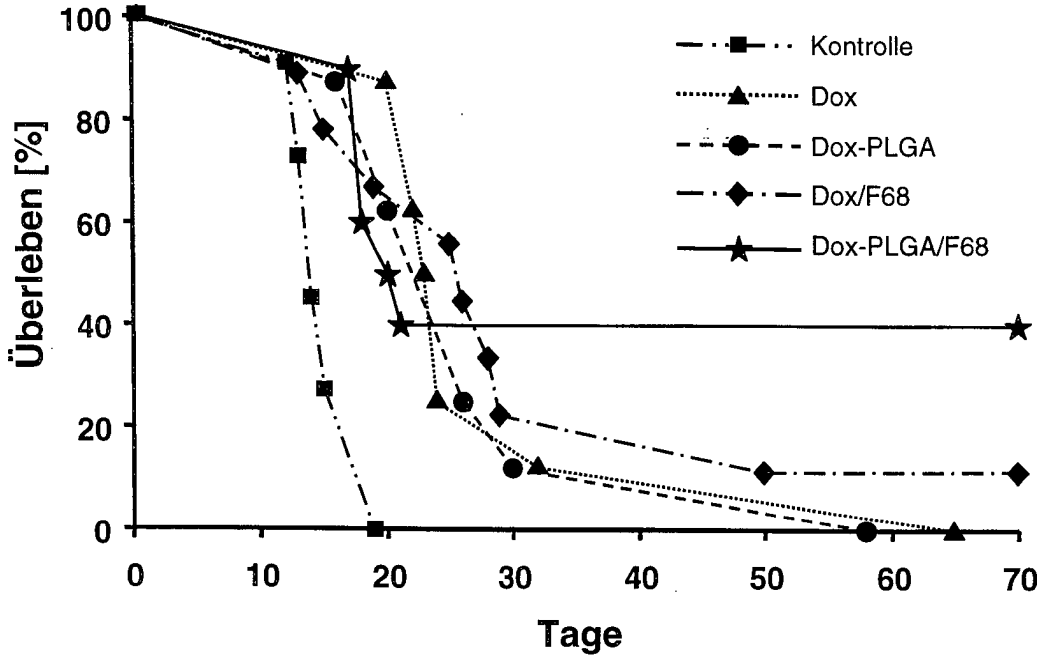


FIG. 1

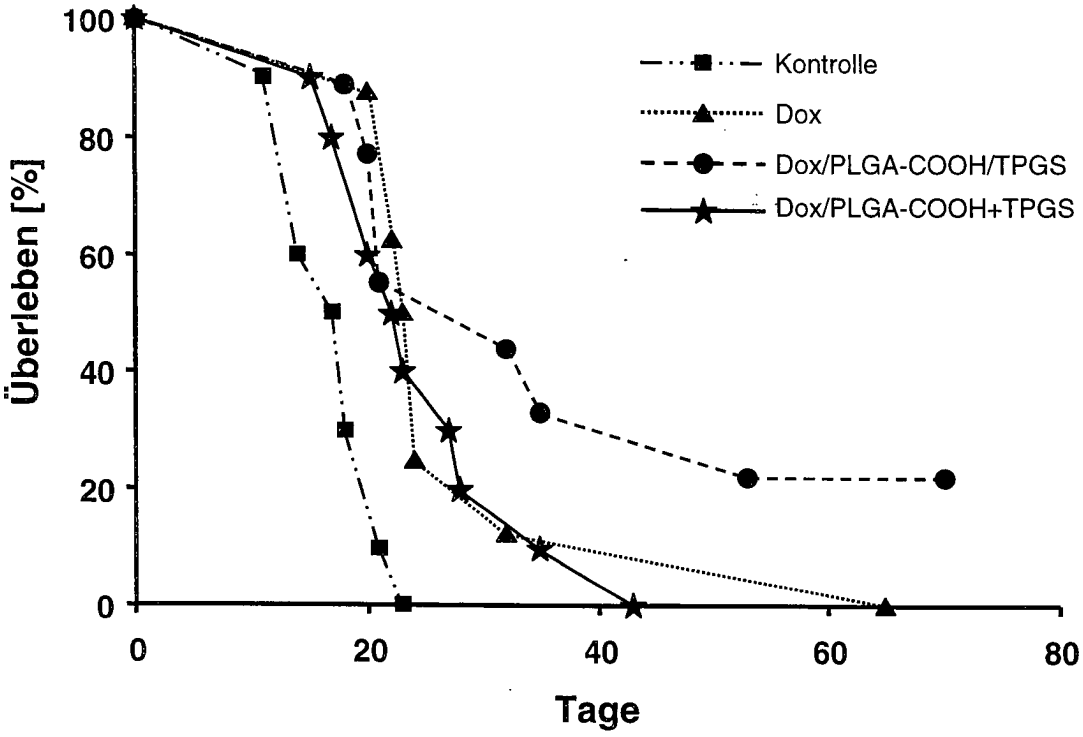

100
80
60
40
20
0
Überleben [%]
0
20
40
60
80
Tage
Kontrolle
Dox
Dox/PLGA-COOH/TPGS
Dox/PLGA-COOH+TPGS

FIG. 2