

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
4. April 2013 (04.04.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2013/045455 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 9/70 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/068889

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. September 2012 (25.09.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2011 114 986.8
28. September 2011 (28.09.2011) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): ETHRIS GMBH [DE/DE]; Lochhamerstraße 11,
82152 Martinsried (DE).

(72) Erfinder; und

(71) Anmelder (nur für US): RUDOLPH, Carsten [DE/DE];
Hohenzollernstraße 14, 80801 München (DE). ÜZGÜN,
Senta [DE/DE]; Agrippasträße 25a, 55131 Mainz (DE).

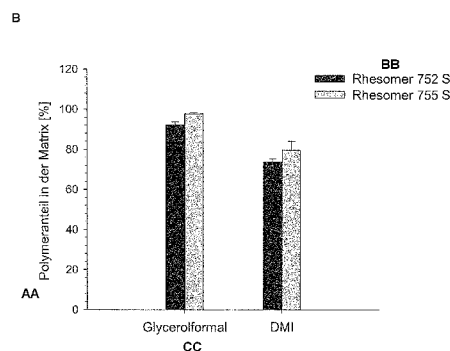
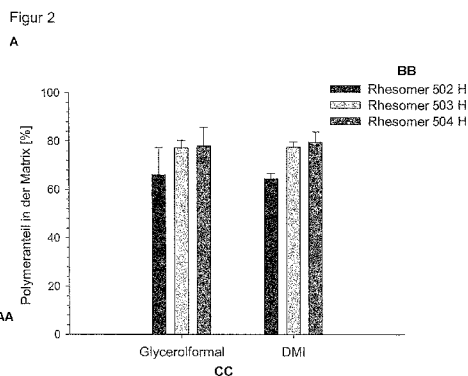
(74) Anwalt: LEIBLER-GERSTL, Gabriele; Hoefler &
Partner, Pilgersheimerstraße 20, 80453 Munich (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SPRAY SYSTEM FOR PRODUCTION OF A MATRIX FORMED IN SITU

(54) Bezeichnung : SPRÜHSYSTEM ZUR ERZEUGUNG EINER IN SITU GEBILDETEN MATRIX



AA ... polymer content in the matrix [%]
BB ... Resomer
CC ... glycerol formal

(57) Abstract: A spray system for production of a matrix which forms in situ is described, this comprising at least one lipophilic component comprising at least one polymer based on glycolic acid and lactic acid and at least one biocompatible solvent having an XlogP3 value of less than 0.2, and at least one hydrophilic component, the at least two components being present separately from one another prior to use and not being mixed until or in the course of spraying, and the components forming a film when sprayed onto human tissue.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Sprühsystem zur Erzeugung einer in-situ sich bildenden Matrix beschrieben, das mindestens eine lipophile Komponente, die mindestens ein auf Glycolsäure und Milchsäure basierendes Polymer und mindestens ein biokompatibles Lösungsmittel mit einem XlogP3-Wert von kleiner 0,2 enthält, und mindestens eine hydrophile Komponente enthält, wobei die mindestens zwei Komponenten vor der Anwendung getrennt voneinander vorliegen und erst zum oder beim Sprühen gemischt werden, wobei die Komponenten beim Aufsprühen auf menschliches Gewebe einen Film bilden.



(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

SPRÜHSYSTEM ZUR ERZEUGUNG EINER IN SITU GEBILDETEN MATRIX

Die Erfindung betrifft ein Sprüh- bzw. Applikationssystem zur Verwendung zur Verhinderung von Adhäsionen, insbesondere chirurgischen Adhäsionen.

Nach Verletzungen und operativen Eingriffen kommt es häufig zu Adhäsionen, die sich zu Verwachsungen und Vernarbungen entwickeln und zu postoperativen Komplikationen führen. Insbesondere bei operativen Eingriffen im Bauchraum entstehen bei bis zu 94% der Patienten primäre postoperative Adhäsionen. Das Peritoneum kleidet als seröse Haut die Bauchhöhle aus und besteht aus einem visceralen und einem parietalen Blatt mit einem serösen Spaltraum, der mit 5 bis 20 ml Flüssigkeit gefüllt ist und ein freies Gleiten der Organe ermöglicht. Histologisch betrachtet besteht das Peritoneum aus einem einschichtigen Plattenepithel, auch Mesothelschicht genannt, und einer schmalen Schicht an subserösem Bindegewebe. Eine Verletzung der Mesothelschicht führt innerhalb weniger Tage zur Ausbildung fester Verwachsungen zwischen den beiden Blättern und dem umliegenden Gewebe. Neben Verletzungen durch einen chirurgischen Eingriff kann die Mesothelschicht auch bereits durch den Einsatz von Tupfern, das Austrocknen der Oberfläche während der Operation oder durch Kontakt mit Talkum von entsprechend gepuderten Handschuhen geschädigt werden. Auch bei minimalinvasiver Chirurgie, wie Laparoskopie, wird der Aktivierungsprozess in Gang gesetzt.

Obwohl schon über ein Jahrhundert an der Pathophysiologie peritonealer Adhäsionen geforscht wurde, sind die Erkenntnisse bis heute noch unvollständig. In Figur 1 ist die Pathogenese peritonealer Adhäsionen mit therapeutischen Ansatzmöglichkeiten zusammenfassend dargestellt. Es wird angenommen, dass durch Traumatisierung des peritonealen Gewebes eine Entzündungsreaktion mit Exsudation von inflammatorischen Zellen und löslichen Fibrinmonomeren entsteht. Innerhalb von ca. 3 Stunden bilden sich daraus erste fibröse Strukturen, die bei ausreichender fibrinolytischer Aktivität durch die Serinprotease

- 2 -

Plasmin innerhalb der ersten Tage aufgelöst werden können. Geschieht dies nicht, kommt es in der Folge zur Bildung von kollagenreichem Bindegewebe, der permanenten Adhäsion, die dann die Schwierigkeiten bereitet.

Während in den ersten zwei Tagen nach der Verletzung vor allem neutrophile Leukozyten am Entzündungsprozess beteiligt sind, spielen Makrophagen und Mesothelzellen eine entscheidende Rolle für die Entstehung der permanenten Adhäsion. Beide Zelltypen sind in der Lage, Plasminogen, eine Vorstufe des Plasmins, in die Blutbahn auszuschütten. In den Blutkapillaren wird Plasminogen durch die Serinprotease Plasminogenaktivator (Tissue/Urokinaseplasminogenaktivator, t-PA/u-PA) in Plasmin umgewandelt. Diese Proteasen werden ebenfalls von der Mesothelschicht sezerniert. Ausgelöst durch eine erhöhte Konzentration an inflammatorischen Cytokinen wie dem Tumornekrosefaktor (TNF), dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF β) oder Interleukinen kommt es in der posttraumatischen Phase zu einem Abfall der aktiven tPA-Konzentration. Dadurch wird die fibrinolytische Aktivität in der Bauchhöhle deutlich reduziert, was zu einem Ungleichgewicht zwischen Fibrinolyse und Fibrinbildung führt und die Ausbildung permanenter Adhäsionen fördert. Der Abfall der aktiven t-PA-Konzentration im Gewebe wiederum ist die Folge einer reduzierten t-PA-Produktion in den Mesothelzellen und einer gleichzeitig erfolgenden Überexprimierung an Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), dem wichtigsten Inhibitor des Gewebeplasminogenaktivators. Vergleichbar dem primären Wundverschluss, bei dem Thrombozyten vermehrt PAI-1 sezernieren, um dadurch eine vorzeitige Lyse des Fibrins zu verhindern und somit den primären Wundverschluss einzuleiten, kommt es in der posttraumatischen Phase zu einer vermehrten Bildung des Plasminogenaktivator-Inhibitors durch Mesothelzellen und Endothelzellen submesothelialer Blutgefäße. Es wird daher davon ausgegangen, dass das t-PA/PAI-1-Gleichgewicht die Schlüsselstelle für die Ausbildung peritonealer Adhäsionen ist.

Zur Therapie der permanenten Adhäsion gibt es verschiedene Ansatzpunkte, wie:

- i) Primärprophylaxe durch Vermeidung von Verletzungen und Entzündungen,
- ii) Verhinderung der Gerinnung von serumhaltigem Exudat durch Antikoagulantien,
- iii) Auflösung der Fibrinstrukturen durch Fibrinolytika,
- iv) Einsatz mechanischer Barrieren bis zur Regeneration der Mesothelschicht durch Separation und
- v) Verhinderung der Fibronisierung.

Der Einsatz von Fibrinolytika und der Einsatz von physikalischen Barrieren wurden als erfolgversprechend für die Therapie angesehen, keiner dieser Ansätze hat sich jedoch aufgrund der damit verbundenen Nachteile in der Klinik durchgesetzt. Es hat sich herausge-

stellt, dass die derzeit verfügbaren Fibrinolytika eine unzureichende antiadhäsive Wirksamkeit haben, was u.a. auf ihre kurze Plasmahalbwertszeit zurückzuführen sein dürfte. Aufgrund der deswegen erforderlichen hohen Dosierung treten starke Nebenwirkungen auf, die den Einsatz verhindern. Bekannte Fibrinolytika sind Streptokinase, Urokinase und das rekombinant hergestellte t-PA-Protein Alteplase (erhältlich als Actilyse®) und dessen modifizierte Form Reteplase (im Handel erhältliche Form Rapilysin®). Alteplase hat eine Plasmahalbwertszeit von nur 3 bis 6 Minuten, die für die modifizierte Form der Reteplase auf 13 bis 16 Minuten gesteigert werden konnte. Aus diesem Grund sind Mehrfachapplikationen und Infusionspumpen notwendig, um kontinuierliche Wirkspiegel zu erzielen, die hohe Nebenwirkungen erzeugen.

Auch physikalische Barrieren wurden bereits zur Reduktion von Adhäsionen eingesetzt. Ein positiver Einfluss auf postoperative Komplikationen konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Die derzeit verfügbaren physikalischen Barriersysteme sind auf das lokale Applikationsfeld begrenzt. Bekannt sind hierfür vor allem resorbierbare Gewebe, wie beispielsweise oxidierte Cellulosefasern, eine Kombination aus Hyaluronsäure und Carboxymethylcellulose oder PEG-Gele.

So ist aus US 2011/0052712 A1 bekannt, Polymere als Adhäsionsbarrieren einzusetzen, die biologisch abbaubar sind. Es wird eine Formulierung zur Erzeugung einer Adhäsionsbarriere vorgeschlagen, die eine Vielzahl von Teilchen aus einer Polymerkombination aus einem biologisch abbaubaren Polymer und mindestens einem wasserlöslichen Polymer enthält, die in Form eines Films auf einem Gewebe abgeschieden wird, um die Adhäsion zu verhindern. Das wasserlösliche Polymer soll dazu dienen, nach dem Auftragen Wasser aus dem Gewebe anzuziehen, aufzuquellen und dadurch die Filmbildung zu ermöglichen und Wasser zur Verfügung zu stellen, damit die Teilchen sich nach und nach abbauen und den gegebenenfalls enthaltenen Wirkstoff freisetzen. Als Wirkstoff kann in diesen Teilchen z.B. ein entzündungshemmendes Mittel enthalten sein. Die Eigenschaften der mit dieser Formulierung erhaltenen Filme hängen jedoch von der am aufgetragenen Ort zur Verfügung stehenden Menge an Wasser ab und sind nicht replizierbar einzustellen.

Es wurde auch schon vorgeschlagen, Wirkstoffe, die die Adhäsion verhindern sollen, am Ort der Verletzung bzw. des Eingriffs aufzutragen. Da Flüssigkeiten nicht lange am gewünschten Ort bleiben, wurden in der Vergangenheit Systeme entwickelt, bei denen Wirkstoffe, gegebenenfalls verkapselt in biologisch abbaubare Polymere, in einer Matrix, die vorgefertigt wird, bereitgestellt werden. Feste Systeme sind jedoch gerade im Bereich des Bauchraums für den Patienten unangenehm. Es wurde daher auch schon vorgeschlagen, stattdessen Gele einzusetzen, die Wirkstoffe enthalten können. So wird beispielsweise in WO 2004/011054 eine Polymerdepotzusammensetzung mit einer Polymermatrix aus verschiedenen Arten von Polymeren mit niedrigem bis hohem Molekulargewicht beschrieben,

die ein Lösungsmittel enthält, das mit Wasser kaum mischbar ist, das die Plastizität des Polymers verbessern soll. Die vorgeschlagene Zusammensetzung ist ein komplexes System aus unterschiedlichen Arten von Polymeren und daher aufwändig in der Herstellung und Verwendung.

Nachteilig bei den bekannten Systemen, die zur Matrixbildung Wasser aus der Umgebung verwenden, indem sie ein wasserlösliches oder wasserquellbares Polymer enthalten, um Wasser in die Matrix zu ziehen, ist es, dass durch das Wasser ein Wirkstoff, der in der Matrix enthalten ist, zu schnell freigesetzt wird, so dass anfangs eine zu hohe Konzentration an Wirkstoff an der Wirkstelle vorhanden ist. Gewünscht ist eine gleichmäßige Abgabe ohne einen so genannten Burst am Anfang. Um dies zu erreichen, wurde in US 2009/0004273 vorgeschlagen, zur Verkapselung von Proteinen und Peptiden ein Polymersystem zu verwenden, das kein Hydrogel bildet, wenn das System mit Gewebswasser in Kontakt kommt. Um eine kontinuierliche lineare Abgabe des Wirkstoffs zu erzeugen und einen Burst zu Beginn zu verhindern werden zwei unterschiedliche Polymersysteme aus einer hydrophoben Komponente und einer hydrophilen Komponente eingesetzt, die beispielsweise als Film oder Beschichtung von Vorrichtungen bereitgestellt werden können.

Um die Einsetzbarkeit von Implantaten flexibler zu gestalten, wurde auch bereits vorgeschlagen, Filme oder Implantate in situ zu bilden. Hierzu beschreibt beispielsweise DE 100 01 863 Implantate, die am vorgesehenen Ort gebildet werden, indem ein Trägermaterial und ein Lösungsmittel hierfür kurz vor der Anwendung vermischt werden, so dass sich zumindest ein Teil des Trägermaterials löst, um dann im Körper flüssigkristalline Phasen zu bilden. Das Trägermaterial wird in Pulverform bereitgestellt und wird z.B. durch Sprühtrocknung erhalten. Insbesondere wenn auch noch ein Wirkstoff enthalten ist, muss dafür gesorgt werden, dass eine ausreichende Vermischung stattfindet, um den Wirkstoff gleichmäßig in der erzeugten Matrix zu verteilen.

Weitere in situ gebildete Trägersysteme wurden zur Herstellung von Implantaten beschrieben. Da Temperatur- und pH-Veränderungen sowie reaktive Bestandteile zur Matrixbildung im Körper direkt nicht eingesetzt werden können, ist die am häufigsten verwendete Technologie die Ausfällung über ein Lösungsmittel. Die Verfestigung des Implantats erfolgt bei den bekannten Verfahren daher meistens durch den Kontakt eines wasserunlöslichen Polymers, das in einer organischen Lösung gelöst ist, mit der Gewebsflüssigkeit. Um die Ausfällung zu beschleunigen, werden bei einigen der bekannten Verfahren, wie oben ausgeführt, der Zusammensetzung Wasser anziehende Bestandteile zugesetzt, z.B. quellbare Polymere. Je nach Trägersystem und verwendetem organischen Lösungsmittel kommt es dann zu einer Viskositätserhöhung unter Bildung eines viskosen Gels, oder zu einer echten Präzipitation des Trägersystems unter Bildung einer Matrix. Häufig wird hierfür ein

Copolymer aus Milch- und Glycolsäure eingesetzt, deren Präzipitation sich über die Wahl des Lösungsmittels und des Polymers steuern lässt. Je nach Molekülgröße der pharmakologisch aktiven Komponente können somit Freisetzungskinetik und -dauer nach Bedarf angepasst werden. Zwei Technologien, die im Stand der Technik beschrieben werden, sind die Atrigel®-Technologie, die N-Methyl-2-pyrrolidon als wassermischbares Lösungsmittel verwendet, und die Alcamer®-Technologie, die schlecht wassermischbare Lösungsmittel einsetzt. Bekanntermaßen führt dabei eine höhere Vermischbarkeit mit Wasser zu einer schnellen Implantatbildung und damit zu einer gesteigerten Porosität der Matrix, während schlecht wassermischbare Lösungsmittel oder hochkonzentrierte Polymerlösungen eine langsamere Implantatbildung bewirken. Erstere führen zu einer schnellen Freisetzung der eingebetteten Komponenten und auch zu einer erhöhten initialen Freisetzung des Wirkstoffs, dem so genannten Burst. Letztere führen zu einer lang anhaltenden Freisetzung, wobei die Freisetzung erst nach einiger Zeit eintritt. Ein Produkt, das auf der Atrigel®-Technologie beruht, ist im Handel erhältlich in Form eines Hormonpräparats zur Behandlung von fortgeschrittenem, hormonabhängigem Prostatakrebs.

Vorteil derartiger Systeme ist es, dass sie direkt am gewünschten Ort angewendet werden können und dass auch ein Wirkstoff während des Auftragens in die Matrix eingebettet werden kann. Das größte Problem bei den bekannten in situ gebildeten Implantaten ist jedoch die Kontrolle der Morphologie des Implantats und damit die Kontrolle über die Wirkstofffreigabe. Die Morphologie des Implantats ist abhängig von den Gegebenheiten am Anwendungsort, was eine Reproduzierbarkeit nahezu unmöglich macht und verhindert, dass eine Freisetzungskinetik vorbestimmt eingestellt werden kann.

Die bisher bekannten Systeme haben somit alle noch Nachteile und sind in der Anwendung noch nicht befriedigend. Es war daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein System bereitzustellen, das diese Nachteile überwindet, das einfach zu verwenden ist, ohne komplizierte oder aufwändige Maßnahmen bei seiner Verwendung und das Adhäsionen nach Verletzungen und chirurgischen Eingriffen zuverlässig vermeiden hilft. Weiterhin soll das System auch die Möglichkeit bieten einen Wirkstoff zu verabreichen, wobei die Abgabe des Wirkstoffs vorhersagbar, einstellbar und gleichmäßig sein soll, ohne zu Beginn einen Burst zu verursachen, aber auch ohne eine zu lange Anlaufzeit.

Weiterhin war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Applikationssystem bereitzustellen, das direkt auf den vorgesehenen Ort aufgesprüht werden kann, das geeignet ist, Wirkstoffe, insbesondere hydrophile Wirkstoffe wie Nucleinsäuren, Proteine und Peptide aufzunehmen und kontrolliert freizusetzen, das am Anwendungsort einen stabilen Film erzeugen kann, dessen Freisetzungseigenschaften eingestellt und optimiert werden können. Außerdem sollte ein Applikationssystem bereitgestellt werden, das physiologisch kompati-

- 6 -

bel ist und die Aktivität von Proteinen, Peptiden und Nucleinsäuren nicht hindert und somit die Freisetzung aktiver Produkte zulässt.

Darüber hinaus war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Applikationssystem bereitzustellen, das chirurgische Adhäsionen wirksam verhüten kann und permanente Verwachsungen vermeiden hilft.

Die oben genannten Aufgaben werden gelöst mit einem sprühfähigen Applikationssystem, wie es in Anspruch 1 definiert ist. Das sprühfähige Applikationssystem, im folgenden auch als Sprühsystem bezeichnet, umfasst mindestens eine lipophile Komponente, die zumindest aus einem Polymer gelöst in einem Lösungsmittel gebildet wird, und eine wässrige Komponente sowie gegebenenfalls mindestens einen Wirkstoff. Es kann weitere Bestandteile umfassen.

Es wurde überraschenderweise festgestellt, dass mit der erfindungsgemäß definierten spezifischen Zusammensetzung ein Trägermaterial zur Verfügung gestellt wird, das einfach zu verwenden ist, das stabil ist, das an der gewünschten Stelle und im gewünschten Ausmaß aufgetragen werden kann und einen Wirkstoff über die gewünschte Dauer bereitstellen und in einer gewünschten Rate freisetzen kann.

Die vorteilhaften Eigenschaften werden erzielt mit einem Sprühsystem, das aus zwei Komponenten besteht, wobei die eine Komponente zumindest ein Polymer gelöst in einem Lösungsmittel aufweist und die andere Komponente mindestens ein wässriges Lösungsmittel aufweist, indem die Komponenten direkt vor oder beim Auftragen vermischt werden und durch Aufsprühen aufgetragen werden, wobei aus den erfindungsgemäßen Komponenten in situ eine Matrix gebildet wird, die nach einem vorgegebenen Zeitraum zerfällt und den gegebenenfalls enthaltenen Wirkstoff in dieser Zeit gezielt freisetzt.

Der mit dem erfindungsgemäßen System gebildete Film hat eine hohe Qualität und bleibt über eine vorbestimmte Zeit am aufgetragenen Ort und übt dort seine Wirkung aus. Nur durch die Kombination der erfindungsgemäßen Merkmale wird ein Trägermaterial mit den gewünschten Eigenschaften erhalten.

Wichtige Merkmale der vorliegenden Erfindung sind die Art des Polymers und des Lösungsmittels sowie die Form der Applikation, d.h. das Inkontaktbringen der beiden Komponenten direkt vor oder beim Sprühen oder während des Sprühens.

Eines der wesentlichen Merkmale des erfindungsgemäßen Systems ist die lipophile Komponente, die mindestens ein auf Glycolsäure und Milchsäure basierendes Polymer und mindestens ein biokompatibles Lösungsmittel für das Polymer enthält, wobei das Lösungsmittel einen vorbestimmten logP-Wert hat, wie unten näher erläutert wird. Diese lipophile Komponente wird dann mit mindestens einer hydrophilen Komponente, die min-

- 7 -

destens ein wässriges Lösungsmittel enthält, direkt vor dem oder beim Aufsprühen vermischt, was durch Ausfällung des Polymers eine Matrix erzeugt, die am aufgesprühten Ort eine physikalische Barriere bildet, die chirurgische Adhäsionen wirksam verhindern kann. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die lipophile Komponente und/oder die hydrophile Komponente mindestens einen Wirkstoff, der beim Aufsprühen und der Filmbildung in den Film eingeschlossen wird und daraus kontrolliert abgegeben wird, der chirurgische Adhäsionen zusätzlich auf physiologischem bzw. biologischem Wege blockiert.

Der besondere Vorteil des vorliegenden Applikationssystems besteht darin, dass durch Auswahl der speziell angewendeten Bestandteile sich beim Aufsprühen durch Ausfällen des Polymers aus dem Lösungsmittel eine Polymermatrix bildet, die, falls die Zusammensetzung einen Wirkstoff enthält, diesen miteinschließt. Unter Ausfällen des Polymers wird verstanden, dass die Löslichkeitsgrenze des Polymers überschritten wird und das Polymer nicht mehr oder nicht mehr vollständig gelöst in dem Lösungsmittel vorliegt. Durch Einstellung der einzelnen Komponenten kann die Ausfällungs- und Filmbildungsgeschwindigkeit und damit die Porosität der entstehenden Matrix vorbestimmt werden, was zu kontrollierten Freigabeeigenschaften führt. Durch die Variabilität dieser Polymere gibt es viele Möglichkeiten, die optimalen Eigenschaften einzustellen, die für den Einzelfall optimale Lösung ist allerdings nicht immer einfach aufzufinden. Im Folgenden werden daher Parameter beschrieben, die die Auswahl eines optimalen Systems zulassen.

Kritisch für das erfindungsgemäße System sind vor allem das verwendete Polymer, das zur Lösung des Polymers verwendete Lösungsmittel, der Anteil an Polymer, Lösungsmittel und wässriger Komponente sowie gegebenenfalls der Anteil an Wirkstoff und dessen Form.

Das für die Bildung der Matrix verwendete Material sollte sterilisierbar sein, und es muss eine kontrollierte Freisetzung eines enthaltenen Wirkstoffs über einen Zeitraum ermöglichen, in dem sich Adhäsionen und Vernarbungen bilden können. Dies ist ein Zeitraum im Bereich von mindestens zwei Wochen und bis zu sechs Wochen und bevorzugt von zwei bis vier Wochen. Darüber hinaus muss das Material eine solche Güte aufweisen, dass es seine Festigkeit ausreichend lange behält, um den gewünschten Zweck, das Verhindern von Adhäsionen, zu erfüllen.

Ein wichtiger Parameter für die Auswahl des geeigneten Polymers ist die Molmasse. Die Auswahl der geeigneten Molekülgröße erfolgt über die inhärente Viskosität (natürlicher Logarithmus der relativen Viskosität bezogen auf die Konzentration C des gelösten Stoffs). In an sich bekannter Weise wird für PLGA-Polymere die inhärente Viskosität gemessen mit 0,1% in CHCl_3 bei 25°C. Als Polymere werden für das erfindungsgemäße System solche mit einer inhärenten Viskosität im Bereich von 0,1 bis 0,8, insbesondere 0,15 bis 0,7

bevorzugt. Liegt der Wert unter 0,1 sind die Polymere häufig zu klein, um eine ausreichend lange Wirkung zu erzielen. Wird der Wert zu groß, kann eine ausreichende Filmgüte nicht gewährleistet werden, außerdem kann die Anlaufzeit für die Freisetzung zu lang sein. Um optimale Eigenschaften zu erzielen, können auch Mischungen von Polymeren mit unterschiedlicher Molmasse verwendet werden.

Die Molmasse der PLGA-Polymere kann auch mit üblichen Verfahren bestimmt werden, z.B. mit Gelpermeationschromatographie. Es wurde gefunden, dass PLGA-Polymere mit einer Molmasse im Bereich von 10 bis 63 kDA gut geeignet sind.

Weitere Faktoren sind für die Auswahl eines für das erfindungsgemäße Applikationssystem geeigneten Polymers hilfreich. Das erfindungsgemäße System muss versprühbar sein, was impliziert, dass es in einem biologisch kompatiblen Lösungsmittel löslich oder suspendierbar sein muss.

Ein Maß für die Qualität und mechanische Festigkeit des aus dem erfindungsgemäßen Applikationssystems gebildeten Films ist die Matrix- bzw. Filmgüte, die mit dem in den Beispielen beschriebenen Verfahren bestimmt werden kann. Figur 2 zeigt die Ergebnisse von in den Beispielen beschriebenen Versuchen zur Filmgüte einiger Kombinationen von Polymeren und Lösungsmitteln. Die Güte wird im Wesentlichen durch die Wahl des Lösungsmittels und der Molmasse des Polymers bestimmt. Zu ihrer Bestimmung wird der prozentuale Anteil des Polymers im Überstand (Verlust) und im Präzipitat (Matrixgüte) bezogen auf die Gesamtmenge an eingesetzten Polymer ermittelt. Die Matrixgüte der entstehenden Schicht bzw. des entstehenden Films ist kritisch für das erfindungsgemäße System, da das System seine Funktion mindestens zwei und bis zu sechs Wochen ausüben soll. Dies ist nur möglich, wenn der gebildete Film bzw. die gebildete Schicht eine ausreichende Festigkeit hat und gleichzeitig die gewünschte Freisetzungskinetik bereitstellt. Die Matrixgüte sollte daher in einem Bereich von 80 bis 100 %, bevorzugt 90 bis 100 % und besonders bevorzugt 95 bis 100 % liegen, wobei der Wert mit dem im Beispiel beschriebenen Verfahren bei Raumtemperatur, d.h. etwa 25°C, bestimmt wird.

Die Matrixgüte hängt unter anderem ab von der Molmasse der Polymere. Es wurde gefunden, dass bei Verwendung von Polymeren mit einer höheren Molmasse eine größere Menge an Polymer in die Matrix eingebaut werden konnte, während bei Polymeren mit geringerer Molmasse Polymer (für die Filmbildung) verloren ging. So wurde gefunden, dass für ein PLGA-Polymer mit einem Verhältnis von Lactid zu Glycolid von 75:25 und einer inhärenten Viskosität von 0,5 bis 0,7, d.h. mit einer relativ hohen Molmasse und bei Verwendung eines Polymers mit veresterten Endgruppen, nahezu 100% der eingesetzten Polymermenge die Matrix ausbildete. Bei Verwendung eines PLGA-Polymers mit einem Verhältnis von Lactid zu Glycolid von 50:50 und einer inhärenten Viskosität von < 0,6 und

mit freien Endgruppen wurde demgegenüber gefunden, dass Polymer bei der Matrixbildung verloren ging, d.h. nicht in die Matrix eingebaut wurde. Dieser Effekt kann sich durch das Lösungsmittel verstärken oder verbessern.

Wie oben ausgeführt ist eine der wesentlichen Komponenten des Systems das verwendete Polymer. Erfindungsgemäß werden für das Applikationssystem auf Glycolsäure und Milchsäure basierende Polymere, nämlich Poly(lactide-co-glycolide), in der Regel Poly(D,L-lactide-co-glycolide), im Folgenden auch als PLGA-Polymere bezeichnet, verwendet. Sowohl auf D,L-Lactid basierende Polymere als auch solche auf dem enantiomer reinen L-Lactid basierenden Polymere können verwendet werden.

Auf Milch- und/oder Glycolsäure basierende Polymere sind schon seit Längerem bekannt, auch für Systeme mit kontrollierter Freisetzung. In der Regel werden PLGA-Polymere zu Mikroteilchen oder Implantaten verarbeitet, die dann in unterschiedlicher Weise eingesetzt werden können. PLGA-Polymere sind biokompatibel und biologisch abbaubar und ihre Eigenschaften können für den jeweiligen Zweck angepasst werden.

Für die vorliegende Erfindung werden in einem Lösungsmittel gelöste auf Glycolsäure und Milchsäure basierende Polymere eingesetzt, deren Freisetzungskinetik über das Molekulargewicht, die Molekulargewichtsverteilung und die Endgruppen eingestellt wird.

So kann durch entsprechende Auswahl des Polymers und des Lösungsmittels ausgewählt werden, ob die entstehende Matrix eine diffusionskontrollierte, erosionskontrollierte oder sowohl diffusions- als auch erosionskontrollierte Freisetzung bewirken soll. Eine schnelle Ausbildung der Matrix mit hoher Güte, wie sie erfindungsgemäß erzielt wird, trägt entscheidend zu einer linearen Freisetzungskinetik ohne initialen Wirkstoffverlust bei.

Es wurde gefunden, dass für das erfindungsgemäße System PLGA-Polymere besser als reines Polylactid (PLA) oder reines Polyglycolid (PGA) geeignet sind. Durch Einstellung des Verhältnisses von Milchsäure- zu Glycolsäureeinheiten können die Eigenschaften, insbesondere die Abbaueigenschaften in an sich bekannter Weise sehr gut eingestellt werden. Für das erfindungsgemäße Applikationssystem haben sich PLGA-Polymere als bevorzugt erwiesen, die ein Verhältnis von Lactid- zu Glycolideinheiten im Bereich von etwa 75 zu etwa 25 bis etwa 25 zu etwa 75 haben. Die Angabe „Verhältnis von Lactid- zu Glycolideinheiten“ bezeichnet immer das molare Verhältnis der Einheiten in einem Polymer. Mischungen verschiedener PLGA-Polymere können ebenfalls eingesetzt werden. Es können Mischungen jeder Art von PLGA-Polymeren eingesetzt werden, z.B. Mischungen aus Polymeren, bei denen molares Verhältnis von Lactid- zu Glycolideinheiten und/oder Molmasse bzw. inhärente Viskosität und/oder Art der Lactideinheiten (D/L oder L) und/oder Endgruppen variieren. Die für den jeweiligen Zweck am besten geeignete Mischung kann durch Routineversuche gefunden werden.

Die Abbauraten der PLGA-Polymere sind abhängig vom Anteil an PGA bzw. PLA, wobei PLGA-Copolymere generell kürzere Abbauraten haben als PLA-Polymere oder PGA-Polymere. Aus diesem Grund sind PLGA-Polymere bevorzugt. Die kürzesten Abbauzeiten werden mit Polymeren erreicht, in denen das Verhältnis von Lactid zu Glycolid 50:50 ist. Eine Erhöhung des PLA-Anteils erschwert aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe im Milchsäuremonomer die Hydrolyse des Polymers und erhöht gleichzeitig die Hydrophobizität, wodurch die Abbauzeiten steigen. Auch eine Steigerung des PGA-Anteils im Polymer oder die Verwendung des reinen Stereoenantiomers L-Milchsäure gegenüber dem Monomer D-/L-Milchsäure verlängern durch Erhöhung der Kristallinität des Polymers die Abbauzeiten der Polymere, da Wasser leichter in amorphe Bereiche diffundiert und folglich diese Bereiche schneller abgebaut werden als kristalline. Somit steigt während des Abbaus die Kristallinität des Polymers stetig. Durch Einstellung des Verhältnisses kann somit die Kristallinität und die Abbauzeit vorbestimmt eingestellt werden. Weiterhin lassen sich die Abbauraten durch kürzere Polymerketten und freie Endgruppen beschleunigen. Freie Endgruppen, d.h. freie Hydroxygruppen und freie Carboxygruppen erhöhen die Hydrophilie des Polymers, wodurch die Diffusionsgeschwindigkeit des Wassers und dessen Anteil in der Polymermatrix gesteigert werden. Freie Carboxylgruppen katalysieren darüber hinaus durch Senkung des pH-Wertes im Inneren der Matrix die Hydrolyse der Polymere. Erfindungsgemäß werden daher bevorzugt Polymere eingesetzt, die freie Endgruppen aufweisen.

Bevorzugt werden erfindungsgemäß PLGA-Polymere mit freien Endgruppen eingesetzt, die ein Verhältnis von Lactid- zu Glycolideinheiten von 40:60 bis 60:40, bevorzugter etwa 50:50 haben und/oder die eine inhärente Viskosität von kleiner 0,6 haben. Wenn PLGA-Polymere mit veresterten Endgruppen verwendet werden, sind solche mit einem Verhältnis von Lactid- zu Glycolideinheiten von 75:25 bevorzugt.

Geeignete PLGA-Polymere sind im Handel erhältlich, beispielsweise Resomer-Polymere (erhältlich von Evonik Industries AG, Essen, Deutschland), insbesondere solche der Resomer[®]H-Serie oder der Resomer[®]S-Serie. Besonders gut geeignete Polymere sind beispielsweise Resomer[®] 502H, 503H und 504H oder Resomer[®] RG755S. In der folgenden Tabelle 1 sind einige Eigenschaften für bevorzugte Polymere aufgelistet:

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Resomer[®] RG Polymere

Resomer [®] RG	PLA/PGA	i.v.* [42]	Säuregruppen** [mg KOH/g]	MwGPC*** [43]	Freisetzung**** [Tagen]
502H	50/50	0,22	9	k.A.	20
503H		0,32	5	34	15
504H		0,51	3	48	70
752S	75/25	0,21	0	12	k.A.
755S		0,63	0	63	30

* inhärente Viskosität (i.v.; 0,1 % Lösung in Chloroform bei 25°C)

** Anzahl der Säuregruppen (potentiometrische Titration) sind den Herstellerdaten entnommen.

*** Molmasse, gemessen via GPC, und

**** die Freisetzungsdaten stammen aus der Publikation von Eliaz und Kollegen [44][Eliaz, 2000 #257]. Die Freisetzungsdaten beziehen sich für Resomer[®] RG 755 S und 503 H auf die Freisetzung von Albumin aus Rinderserum [44] und für Resomer[®] RG 502 H und 504 H auf die Freisetzung von Thymus-DNA [45] aus einem injizierbaren Implantat (10 % bis 20 % PLGA (m/v) in Tetraglykol).

Der Abbau der Polymermatrix erfolgt über Esterhydrolyse zu den biokompatiblen Monomeren Milchsäure und Glycolsäure, die anschließend über den Krebszyklus zu CO₂ und Wasser metabolisiert werden. Das Abbauverhalten der PLGA-Implantate beruht auf einer Bulk-Erosion, die dadurch charakterisiert ist, dass Wasser schneller in die Polymermatrix hineindiffundiert als der Abbau des Polymers erfolgt. Dementsprechend kommt es zu einem homogenen Massenverlust über den gesamten Querschnitt der Polymermatrix. Der Abbauprozess lässt sich generell in drei Abschnitte unterteilen:

1. Hydratation: Das Polymer nimmt Wasser auf und quillt, wobei bereits ein geringer Anteil an Esterbindungen gespalten wird. Es findet allerdings noch kein Masseverlust statt.
2. Abbau: Die mittlere Molmasse nimmt stark ab. Die bei der Spaltung der Esterbindungen entstehenden Carbonsäuregruppen führen zu einem pH-Abfall innerhalb der Matrix und infolgedessen zur Autokatalyse der Esterspaltung. Das Polymer verliert an mechanischer Stärke bzw. mechanischer Festigkeit.

3. Lösung: Zum Ende des Abbaus lösen sich niedermolekulare Fragmente und Oligomere im umliegenden Medium, wobei die gelösten Polymerfragmente wiederum zu freien Carbonsäuren hydrolysiert werden.

Die Abbauezeiten sind für die Freisetzung verkapselter Makromoleküle und nanoskaliger Trägermaterialien entscheidend, da diese aufgrund ihrer Größe vorwiegend durch Matrixerosion freigesetzt werden und somit über die Abbauraten eine gezielte Einstellung der Freisetzungsraten ermöglicht wird. Die Abbauezeiten der PLGA-Polymere lassen sich durch ihre Zusammensetzung und die Molmasse der Polymere steuern, wobei in der Regel für die im Handel befindlichen PLGA-Polymere die inhärente Viskosität als Maß für die Molmasse angegeben ist.

Auch die viskoelastischen Eigenschaften des Systems spielen eine Rolle, wie in Figur 3 und in den Beispielen gezeigt.

Für das erfindungsgemäße Applikationssystem ist es wesentlich, dass ein Material hoher Güte erzeugt wird, das seine mechanische Stärke bzw. Festigkeit so lange behält, wie es notwendig ist, um Adhäsionen zu verhindern und das danach abgebaut wird. Wenn das aus dem erfindungsgemäßen Applikationssystem gebildete Trägersystem mit Wirkstoff beladen ist, ist es zusätzlich notwendig, dass der Wirkstoff mit der gewünschten Freisetzungskinetik freigesetzt wird.

Die Matrixgüte des aus dem erfindungsgemäßen Applikationssystems erhaltenen Films hängt ab von dem eingesetzten Polymer, dem zu seiner Lösung verwendeten Lösungsmittel und dessen Wasserlöslichkeit. Es wurde gefunden, dass das für die Auflösung des PLGA-Polymers verwendete Lösungsmittel einen erheblichen Einfluss auf die Güte der damit erzeugten Matrix hat. Die bei Vereinigung des in dem Lösungsmittel gelösten PLGA mit der wässrigen Phase erzeugte Matrix hängt somit ab von der Art und Menge des Lösungsmittels, insbesondere von dessen Hydrophilie.

Die Auswahl des Lösungsmittels hängt andererseits auch von der Art des eingesetzten Polymers ab. Je lipophiler das Polymer ist, desto lipophiler muss das Lösungsmittel sein. Die Lipophilie des Polymers hängt unter anderem ab von den Endgruppen, da ein PLGA mit freien Säuregruppen hydrophiler ist als ein PLGA mit veresterten Endgruppen.

Das Lösungsmittel muss einerseits das ausgewählte Polymer ausreichend in Lösung bringen, damit das Polymer versprüht werden kann, andererseits muss die Löslichkeit des Lösungsmittels in Wasser ausreichend hoch sein, damit die Ausfällung nach dem Aufsprühen der beiden Komponenten schnell erfolgen kann. Ein zur Auswahl des geeigneten Lösungsmittels nützlicher Parameter ist der logP-Wert.

Da sich, wie oben ausgeführt auch die Matrixgüte in Abhängigkeit von der Molmasse des Polymers durch das Lösungsmittel verändert, ist ein weiteres wesentliches Merkmal der Erfindung das Lösungsmittel. Ein wichtiger Parameter zur Auswahl des Lösungsmittels ist die Mischbarkeit mit Wasser. Je höher die Mischbarkeit mit Wasser ist, desto schneller erfolgt die Matrixbildung, allerdings wird auch die Porosität höher, je geringer die Mischbarkeit mit Wasser ist, desto langsamer erfolgt die Matrixbildung, desto höher wird aber auch die Güte.

Die Wassermischbarkeit eines Lösungsmittels lässt sich über den logP-Wert beurteilen.

Der logP-Wert bezeichnet den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, d.h. das Verhältnis der Konzentration des Lösungsmittels in einem Zwei-Phasen-System aus 1-Octanol und Wasser. Die Definition des logP-Wertes ist:

$$\log P = \log \frac{c_0^{S_i}}{c_\Omega^{S_i}} = \log c_0^{S_i} - \log c_\Omega^{S_i}.$$

Die Berechnung bzw. Bestimmung des logP-Wertes ist an sich bekannt. Ein zur Bestimmung des logP-Wertes geeigneter Algorithmus ist XlogP3, wie in Cheng et al. (Cheng T., Zhaoy, Lix, Lin F., Xu Y., Zhang X. et al., Computation of Octanol-Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. J. Chem. Inf. Model. 2007; 47:2140-2148) beschrieben. Der so berechnete logP-Wert liefert für lipophile Substanzen positive Werte und für hydrophile Substanzen negative Werte. Es wurde gefunden, dass für das erfindungsgemäße System solche Lösungsmittel in Betracht kommen, deren Lipophilie nicht zu hoch ist, sodass solche Lösungsmittel bevorzugt sind, die einen negativen oder zumindest sehr kleinen positiven XlogP3-Wert haben.

Für das erfindungsgemäße System haben sich Lösungsmittel mit einem XlogP3-Wert von kleiner 0,2, bevorzugt kleiner 0 und insbesondere im Bereich von -0,2 bis -1,5, besonders bevorzugt solche mit einem XlogP3-Wert zwischen -0,25 und -1,0, als geeignet erwiesen, wobei der XlogP3-Wert umso größer sein sollte, je lipophiler das verwendete Polymer ist.

Es wurde festgestellt, dass dann, wenn eine Polymerlösung, bei der das Lösungsmittel einen logP von kleiner 0,2 hat, mit einer wässrigen Komponente vermischt und durch Aufsprühen auf den Applikationsort gebracht wird, in vorherbestimmbarer und reproduzierbarer Art und Weise eine Ausfällung erfolgt, die einen Polymerfilm mit gewünschten Eigenschaften erzeugt.

Je lipophiler das eingesetzte Polymer ist, desto lipophiler muss das eingesetzte Lösungsmittel sein und desto geringer ist dessen Wassermischbarkeit. Je größer der Unterschied ist zwischen der Löslichkeit der Polymere im Lösungsmittel bzw. Wasser, desto stärker ist der Einfluss auf die Kinetik der Filmbildung. Wird daher als PLGA-Polymer ein solches mit veresterten Endgruppen eingesetzt, das somit eine höhere Lipophilie hat, sollte auch das

eingesetzte Lösungsmittel lipophiler sein. Ein lipophileres Lösungsmittel hat eine schlechtere Wassermischbarkeit und führt daher zu einer hohen Matrixgüte. Es wurde festgestellt, dass die besten Ergebnisse dann erzielt werden, wenn sich das System aus Polymer und Lösungsmittel nahe der Löslichkeitsgrenze bewegt und das Lösungsmittel eine möglichst gute Wassermischbarkeit aufweist, sodass bei Zusatz der wässrigen Phase eine schnelle und vollständige Filmbildung auftritt, wobei ein hoher Anteil des Polymers in der Matrix zu finden ist.

Die Löslichkeit des Polymers in dem Lösungsmittel spielt ebenfalls eine Rolle. Je besser gelöst das Polymer in dem Lösungsmittel ist, desto mehr Wasser ist später erforderlich, um das Polymer aus dem Film auszufällen und einen Film zu bilden. Andererseits muss die Löslichkeit so sein, dass ein ausreichender Anteil an Polymer in dem Lösungsmittel gelöst werden kann. Es wurde gefunden, dass ein Lösungsmittel, das für das einzusetzende PLGA bei Raumtemperatur eine Löslichkeit von mindestens 5% (Masse/Volumen) (m/v), bevorzugt von 5 bis 60 %, und insbesondere eine Löslichkeit von 10 bis 30% hat, zur Bildung eines Films hoher Güte geeignet ist. Bei der Auswahl des geeigneten Lösungsmittels ist von folgenden Beziehungen auszugehen: Die Löslichkeit eines Lösungsmittels für ein Polymer nimmt mit steigender Molmasse des Polymers ab. Je lipophiler das Polymer ist, d.h. je stärker verestert das Polymer ist bzw. je länger die Polymerkette ist, desto lipophiler muss das Lösungsmittel sein. So wird bei Verwendung eines sehr lipophilen Polymers mit einem stark wasserlöslichen Lösungsmittel das Polymer nur in geringem Maße gelöst, während ein nicht so lipophiles Polymer, z.B. eines mit freien Säuregruppen und geringerer Molmasse in einem hydrophilen Lösungsmittel gut gelöst werden kann. Andererseits ist umso mehr Wasser für die Ausfällung notwendig, je besser gelöst das Polymer ist. Sehr gute Ergebnisse können dann erzielt werden, wenn Polymer und Lösungsmittel so ausgewählt werden, dass die Löslichkeit zwischen 5 und 15% liegt, wobei das Lösungsmittel einen XlogP3-Wert im Bereich von -0,3 bis -1,0 hat. Für diese Kombination wird bei Zusatz von Wasser das Polymer sehr schnell ausgefällt und bildet einen Film hoher Güte. Lösungsmittel mit einem XlogP3-Wert in diesem Bereich sind dem Fachmann bekannt.

Ein gut geeignetes Lösungsmittel verbindet somit eine gute Wassermischbarkeit mit einer solchen Polymerlöslichkeit, dass bei der gewünschten Menge an Polymer die Löslichkeit in dem Lösungsmittel bei der Anwendungstemperatur, d.h. zwischen 30 und 40°C, nahe der Sättigungsgrenze ist, wobei die Löslichkeit bei Raumtemperatur in jedem Fall ausreichend sein muss, dass eine stabile Lösung gebildet wird.

Als besonders geeignet haben sich Tetraglycol, Glycerolformal und Dimethylisosorbit (DMI) erwiesen. Das als Tetraglycol oder auch Glycofurol bezeichnete Lösungsmittel Tetrahydrofurfurylalkohol-Polyethylenglycol ist ein Lösungsmittel, das schon lange für Paren-

teralia verwendet wird. Konzentrationen bis 50% werden eingesetzt und in dieser Verdünnung zeigt das Lösungsmittel nur eine geringe Toxizität.

Glycerolformal ist ein geruchloses Lösungsmittel mit geringer Toxizität, das aus einer Mischung von 1,3-Dioxan-5-ol und 1,3-Dioxolan-4-methanol besteht und ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für zahlreiche Pharmazeutika und Kosmetika darstellt. Es wird vor allem in der Veterinärmedizin als Lösungsmittel für Injektionen verwendet. Im Handel erhältlich ist Glycerolformal z.B. als Ivumec[®] und PTH[®]. Ivumec[™] ist mit 0,27% zur subcutanen Applikation in Schweinen zugelassen und wird üblicherweise mit 0,1 ml/kg eingesetzt.

Dimethylisobutylid (DMI) ist bekannt für die topische Anwendung. Im Handel erhältliche Präparate, die DMI enthalten, sind Mykosert[®] und Ibuprofen-Gel[®]. DMI wird als Penetrationsverstärker topisch angewendet. Eine geringe hämolytische Aktivität wurde beobachtet.

Es wurde gefunden, dass die Filmgüte des aus dem erfindungsgemäßen Applikationssystem gebildeten Films umso höher ist, je höher die Wassermischbarkeit des eingesetzten Lösungsmittels ist. In den Beispielen sind Versuche gezeigt zur Bestimmung der Filmgüte. Figur 4 zeigt die Filmgüte für einige Kombinationen aus PLGA-Polymer und Lösungsmittel. Die Wasserlöslichkeit der oben genannten Lösungsmittel nimmt in folgender Reihenfolge ab: Glycerolformal > DMI > Tetraglycol. Glycerolformal ist daher in den meisten Fällen das am meisten bevorzugte Lösungsmittel für das erfindungsgemäße Applikationssystem, solange es ausreichend Polymer lösen kann. Die folgende Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Eigenschaften einiger getesteter Lösungsmittel:

Tabelle 2: Eigenschaften einiger Lösungsmittel

Bezeichnung	η [mPas]*	XlogP3**	PLGA Löslichkeit***	Anwendung	FAM
Glycerolformal	14,4	-0,8	33 %	parenteral	Ivomec [®] Peteha [®]
Tetraglykol	16,6	-0,3	k. A.	parenteral	Phenhydan [®] Eusaprim
DMI	8,16	-0,6	41 %	topisch	Mykosert [®] Ibutop Gel [®]
Triacetin	18,75	0,2	35 %	parenteral	k. A.
Ethyl-l-lactat	2,74	0,2	46 %	k. A.	k. A.

* Die kinematische Viskosität η wurde an einem Rotationsviskosimeter (MRC 100, Paar Physics) bei 25°C bestimmt,

** XlogP3 Daten sind errechnete Werte [32]

*** Löslichkeitsdaten wurden einer Publikation von Matschke et al., 2002 entnommen [33].

Die Schichtdicke der aus dem erfindungsgemäßen Sprühsystem gebildeten Matrix spielt für die Diffusionsgeschwindigkeit des Wassers eine Rolle. So konnte für PLGA-Systeme mit einer Schichtdicke von 150-300 μm , bei denen die Diffusionsgeschwindigkeit des Wassers eingeschränkt ist, zusätzlich eine Oberflächenerosion nachgewiesen werden. Unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel wurden für Filme auf Basis von Resomer® RG 502 H Schichtdicken von circa 300 μm während der viskoelastischen Untersuchungen gemessen. Im Gegensatz dazu nahm die Schichtdicke der Filme für das längerkettige Polymer analog zur beobachteten Freisetzungskinetik von DMI über Glycerolformal zu Tetra glykol hin zu.

Ein weiteres sehr wichtiges Merkmal für das für das erfindungsgemäße Applikationssystem einzusetzende Lösungsmittel ist die Biokompatibilität bzw. die Gewebeverträglichkeit. In der vorliegenden Anmeldung wird die Gewebeverträglichkeit festgestellt durch den Einfluss des Lösungsmittels auf die metabolische Zellliabilität über einen Zeitraum von 11 Stunden. Ein Verfahren zur Bestimmung ist in den Beispielen beschrieben. Der dabei festgestellte LD₅₀-Wert ist das Maß für die Toxizität. Der LD₅₀-Wert muss mindestens 1, bevorzugt mindestens 10 mg/ml betragen, um ein Lösungsmittel für das vorliegende Applikationssystem in Betracht zu ziehen. Die oben genannten besonders bevorzugten Lösungsmittel erfüllen diese Voraussetzung. Als besonders geeignet hat sich in diesem Zusammenhang Glycerolformal erwiesen, das einen LD₅₀-Wert von ca. 1 g/ml bei einer Inkubationszeit unter 6 Stunden hat. Glycerolformal ist daher ein für das erfindungsgemäße System besonders bevorzugtes Lösungsmittel. In Figur 5 sind LD₅₀-Werte für bevorzugte Lösungsmittel abhängig von der Inkubationszeit gezeigt.

In einer Ausführungsform besteht das erfindungsgemäße Applikationssystem nur aus einer lipophilen Komponente mit Polymer und Lösungsmittel, wie oben beschrieben, und Wasser als zweiter Komponente. Mit diesen Bestandteilen, wenn sie die oben angegebenen Bedingungen erfüllen, kann durch Vermischen und Sprühen ein Film in situ erzeugt werden, der chirurgische Adhäsionen wirkungsvoll verhindern kann.

Für die Erfindung wesentlich ist es, dass das erfindungsgemäße Sprühsystem die lipophile Komponente und die wässrige Komponente bis zum Aufsprühen getrennt voneinander enthält. Erst beim oder direkt vor dem Versprühen bzw. während des Sprühens dürfen die

Komponenten vermischt werden. Es wurde gefunden, dass schon der Zusatz vergleichsweise kleiner Mengen an Wasser zu einer Präzipitation von Polymer führt. Würde diese Präzipitation zu früh erfolgen, so könnte die Filmbildung gestört werden und ggf. auch die Sprühhvorrichtung durch Ablagerung von Polymer verstopft werden. Bevorzugt sollte daher das Vermischen direkt während des Versprühens erfolgen, z.B. indem die jeweils vorgesehenen Mengen der beiden Komponenten in eine Mischkammer geführt und direkt daraus während des Vermischens aus dieser versprüht werden. Vermischen und Versprühen sollten somit bevorzugt im Wesentlichen gleichzeitig erfolgen.

In einer weiteren Ausführungsform wird ein Applikationssystem zur Verfügung gestellt, das zusätzlich einen Wirkstoff enthält. Als Wirkstoffe kommen alle für den vorgesehenen Applikationsort nützlichen Stoffe in Betracht. Das erfindungsgemäße Applikationssystem ist besonders geeignet für die Freisetzung von Nucleinsäuren, Proteinen und Peptiden. Somit können sowohl Proteine und Peptide direkt als auch die sie codierenden Nucleinsäuren oder auch eine Mischung davon freigesetzt werden. Es wurde gefunden, dass das erfindungsgemäße Applikationssystem und der daraus gebildete Film die Nucleinsäuren in solcher Form freigibt, dass ihre nachfolgende Expression möglich ist. Da das erfindungsgemäße System zur Verhinderung von Adhäsionen vorgesehen ist, werden bevorzugt fibrinolytische Proteine und Peptide bzw. die entsprechenden diese codierenden Nucleinsäuren als Wirkstoffe verwendet.

Der Wirkstoff kann in einer der beiden Komponenten gelöst oder dispergiert vorliegen. Es wurde gefunden, dass ein zu hoher Anteil an wässriger Phase die Qualität des gebildeten Films beeinflussen kann. Wenn daher ein Wirkstoff zugefügt werden soll, dessen Wasserlöslichkeit nicht ausreichend hoch ist, um hochkonzentrierte Lösungen herzustellen, ist es bevorzugt, den Wirkstoff in bereits ausgefallter Form, z.B. in getrockneter Form zuzusetzen. Geeignet sind insbesondere Lyophilisate oder Polyplexe in kleinteiliger fester Form, die in der lipophilen Komponente dispergiert werden können. Dies hat darüberhinaus den Vorteil, dass der Wirkstoff in fester Form für die Lagerung stabiler ist.

Wie oben ausgeführt spielen insbesondere gewebespezifische Plasminogenaktivatoren und deren Inhibitoren bei der Bildung von Adhäsionen eine Rolle. Erfindungsgemäß wird daher in einer Ausführungsform ein „genaktivierter“ *in situ* gebildeter Film durch Aufsprühen lokal appliziert zur Therapie peritonealer Adhäsionen. Da es, wie oben ausgeführt, nach einer Operation im Bauchraum in einem Zeitfenster von 2-3 Wochen zu permanenten Verwachsungen kommen kann und da davon ausgegangen wird, dass der Auslöser hierfür ein Ungleichgewicht zwischen dem gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPA) und dessen Inhibitor (PAI-1) ist, wird erfindungsgemäß dieses Ungleichgewicht verändert, indem tPA zur Verfügung gestellt und/oder PAI-1 gehemmt wird. Dies erfolgt mit dem *in situ* gebildeten Film, der tPA und/oder PAI-1-Inhibitor und/oder diese codierende Nuclein-

säuren enthält. Es wurde gefunden, dass bei Verwendung des erfindungsgemäßen Sprühsystems, das ein für tPA kodierendes Plasmid enthält, bei Erzeugung eines Film dieses in die Filmmatrix eingebaut wird, daraus nach und nach abgegeben wird und mindestens zwei Wochen lang zu einer Steigerung des tPA-Spiegels in der physiologischen Umgebung führt. Der tPA-Spiegel in der physiologischen Umgebung des aufgesprühten Films kann auch erhöht werden, indem PAI-1-Inhibitor in die Umgebung gebracht wird oder durch eine Kombination aus beiden. In den Beispielen und in den Figuren 10 und 11 werden Eigenschaften und Resultate mit derartigen Filmen beschrieben.

Dabei wurde gezeigt, dass der Einbau eines für tPA kodierenden Plasmids in einen erfindungsgemäßen Film basierend auf Glycerolformal mit Resomer[®] RG 504 H im Zellkulturversuch den tPA-Spiegel über einen Zeitraum von 16 Tagen auf 2 ng/ml erhöhen konnte. Dies entspricht einer 4-fachen Steigerung der tPA-Konzentration gegenüber der Kontrolle. Da in Gewebe, das einem chirurgischen Eingriff ausgesetzt war, ebenso wie in Gewebe, das entzündet ist die tPA-Konzentration bis auf ein fünftel der Normwerte und mehr absinken kann, kann mit einem aus dem erfindungsgemäßen Sprühsystem erzeugten Film somit über längere Zeit eine therapeutisch relevante Steigerung des tPA-Spiegels erreicht werden, die mit den Präparaten des Standes der Technik nicht zu erzielen war.

Weiterhin wurde gefunden, dass der Spiegel des Inhibitors im beanspruchten und/oder entzündeten Gewebe bis auf das 17-fache erhöht sein kann, was eine erhebliche Senkung des tPA-Spiegels bewirkt. Dadurch kann das tPA/PAI-1-Verhältnis von 3,5 im Normalzustand bis zu 0,4 im entzündeten Gewebe variieren. Um daher das Geschehen nach einem chirurgischen Eingriff noch wirkungsvoller zu beeinflussen und Adhäsionen noch erfolgreicher zu bekämpfen, enthält das erfindungsgemäße Sprühsystem besonders bevorzugt sowohl mindestens einen gewebespezifischen Plasminogenaktivator oder eine diesen codierende Nucleinsäure als auch mindestens einen Plasminogenaktivatorinhibitor-Inhibitor oder eine diesen codierende Nucleinsäure. Wie in den Beispielen gezeigt, gelingt es wirkungsvoll, das tPA/PAI-1 Gleichgewicht wieder einzustellen, indem mit dem erfindungsgemäßen Sprühsystem ein Film erzeugt wird, der eine Kotransfektion einer tPA kodierenden Plasmid-DNA und einer siRNA gegen PAI-1 bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Kotransfektion einer für tPA kodierenden Plasmid-DNA und einer siRNA gegen PAI-1 zu einer 8,3-fachen Steigerung des tPA/PAI-1-Verhältnisses 48 h nach der Transfektion führt, wohingegen die Applikation des Plasmids alleine lediglich eine Steigerung um den Faktor 4,5 erbrachte. Je nach gewünschter Wirkung kann das erfindungsgemäße Sprühsystem daher entweder mindestens einen gewebespezifischen Plasminogenaktivator oder mindestens einen PAI-1-Inhibitor oder eine Kombination aus beiden bzw. jeweils die entsprechenden Nucleinsäuren enthalten. Damit lässt sich mit dem erfindungsgemäß bereitgestellten System die gewünschte Wirkung sehr variabel einstellen.

Bei den oben beschriebenen Ausführungsformen kann die Nucleinsäure RNA, DNA, mRNA, siRNA, miRNA, piRNA, shRNA, Antisense-Nucleinsäure, Aptamer, Ribozym, katalytische DNA und/oder eine Mischung davon sein. Der Ausdruck DNA umfasst alle geeigneten Formen von DNA wie cDNA, ssDNA, dsDNA, etc., der Ausdruck RNA umfasst alle geeigneten Formen von RNA wie mRNA, siRNA, miRNA, piRNA, shRNA etc.

Die Nucleinsäure kann linear oder ringförmig sein, sie kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein. Unter dem Begriff „Nucleinsäure“ wird auch eine Mischung von Nucleinsäuren verstanden, die jeweils gleiche oder unterschiedliche Proteine oder Peptide codieren können. Alle Formen von Nucleinsäuren, die das gewünschte Protein oder Peptid codieren und an der gewünschten Stelle exprimieren können, sind geeignet. Der Fachmann kennt die jeweils geeigneten Formen von Nucleinsäuren und kann die jeweils am besten geeignete auswählen. Die Nucleinsäure kann dabei aus jeder beliebigen Quelle stammen, z.B. aus einer biologischen oder synthetischen Quelle, aus einer Genbibliothek oder Sammlung, es kann genomische oder subgenomische DNA, aus Zellen oder Mikroorganismen gewonnene oder synthetisch erzeugte RNA sein, etc. Die Nucleinsäure kann die zu ihrer Amplifikation und Expression notwendigen Elemente aufweisen, wie z.B. Promotoren, Enhancer, Signalsequenzen, Ribosomenbindungsstellen, Tails etc.

Die Nukleinsäure kann eine DNA oder RNA sein und sie kann ein oder mehrere Gene oder Fragmente aufweisen. Die Nukleinsäure kann eine autonom replizierende oder integrierende Sequenz sein, sie kann als Plasmid, Vektor oder in anderer dem Fachmann wohlbekannter Form sein. Sie kann linear oder ringförmig und einzel- oder doppelsträngig sein. Jede in einer Zelle aktive Nucleinsäure ist hier geeignet. Da „nackte“ Nucleinsäuren nicht sehr stabil sind und in der Zelle schnell inaktiviert und abgebaut werden, ist es bevorzugt die Nucleinsäure mit einer Schicht zu umhüllen, wobei sogenannte Polyplexe eine besonders bevorzugte Ausführungsform sind.

Um die Nucleinsäure zu schützen, kann sie in Form sogenannter Polyplexe eingesetzt werden. Polyplexe sind Nucleinsäuremoleküle, die von einer Polymerhülle umgeben sind. Bevorzugt wird als Hüllmaterial ein kationisches Polymer verwendet. Es wurde gefunden, dass kationisch geladene Teilchen von der Zelle leichter aufgenommen werden können als neutrale oder anionisch geladene Teilchen, allerdings können sie auch eher unspezifische Anlagerungen fördern. Zur Umhüllung von Nukleinsäuren als aktiven Bestandteilen sind kationische Hüllmaterialien bevorzugt, da sich Nukleinsäuren sehr einfach mit kationischen Substanzen umhüllen und schützen lassen. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann wohlbekannt.

Das Hüllmaterial kann eine natürlich vorkommende, synthetische oder kationisch derivatisierte natürliche Substanz sein, z.B. ein Lipid oder ein Polymer oder Oligomer. Ein Bei-

spiel für ein natürliches Oligomer ist Spermin. Beispiele für synthetische Polymere sind stickstoffhaltige biologisch abbaubare Polymere, insbesondere solche mit protonierbaren Stickstoffatomen. Besonders geeignet sind Polyethylenimine, insbesondere verzweigte Polyethylenimine, die im Handel erhältlich sind. Geeignet ist beispielsweise ein verzweigtes Polyethylenimin mit einem mittleren Molekulargewicht von 25 kDa, das kommerziell verfügbar ist. Es wurde gefunden, dass dieses Polymer mit den anderen Bestandteilen des erfindungsgemäßen Sprühsystems sehr verträglich ist. Als natürliches ggf. derivatisiertes schichtbildendes Hüllmaterial können auch Lipide, insbesondere kationische oder neutrale Lipide, eingesetzt werden. Lipide sind in vielen Varianten verfügbar und können z.B. zur Bildung von Liposomen eingesetzt werden.

Wenn Polyplexe als Wirkstoff verwendet werden, sollte das Verhältnis von Hüllmaterial zu Nucleinsäure in an sich bekannter Weise so eingestellt werden, dass die Nucleinsäure ausreichend geschützt ist, nach Freisetzung aber exprimiert werden kann. Wenn zu wenig Hüllmaterial vorhanden ist, wird die Nucleinsäure nicht ausreichend geschützt. Ist der Anteil des Hüllmaterials zu hoch, kann es einerseits Probleme mit der Verträglichkeit geben und andererseits kann ein zu hoher Anteil an Hüllmaterial dazu führen, dass die Nucleinsäure nicht mehr freigesetzt und/oder nicht mehr exprimiert werden kann. In beiden Fällen leidet die Effizienz des Transfers. Der Fachmann kann in wenigen Routineversuchen das jeweils am besten geeignete Verhältnis herausfinden. Als besonders geeignet hat sich ein Verhältnis von Hüllmaterial zu Nucleinsäure im Bereich von 10:1 bis 1:4, bezogen auf Gewicht, erwiesen. Besonders bevorzugt ist ein Verhältnis von Hüllmaterial zu Nucleinsäure von 4:1 bis 1:4. Wenn die Polyplexe Polyethylenimin als Polymer enthalten, kann der Anteil des Polymers auch über das molare Verhältnis von Polymer-Stickstoffanteil zu DNA-Phosphatanteil (N/P) angegeben werden; bevorzugt liegt das N/P-Verhältnis in einem Bereich von 1 bis 10, besonders bevorzugt von 4 bis 8.

Die Polyplexmoleküle sind so ausgebildet, dass die Nucleinsäure während Lagerung, Transport und bis zur Applikation geschützt ist und dann am Zielort die Nucleinsäure freigesetzt und exprimiert wird. Geeignete Polymere sind in der Literatur vielfach beschrieben und der Fachmann kann aus einer Vielzahl von Materialien das jeweils am besten geeignete auswählen.

Erfahrungen mit Nukleinsäuren als Arzneistoffe wurden seit der ersten klinischen Studie im Jahre 1989 in über 1400 klinische Studien gesammelt. Neben retroviralen kamen vor allem adenovirale Gentransfersysteme zum Einsatz, wobei ein großer Vorteil in der Effizienz dieser Systeme liegt. So konnte gezeigt werden, dass bereits die Bindung eines einzigen Viruspartikels ausreichend ist, die Zielzelle zu infizieren. Nicht-virale Gentransfersysteme stellen eine bezüglich Immunogenität und Mutagenesepotential sichere Alternative zu viralen Systemen dar. Beschrieben wurden für nicht-virale gentherapeutische Ansätze

ze die Applikation nackter Nukleinsäure in Kombination mit physikalischen Methoden wie der Elektroporation, sowie die Verwendung von nanoskaligen Komplexen mit synthetischen Trägersystemen wie kationischen Polymeren, die auch als Polyplexe bezeichnet werden. Informationen zur Herstellung und Verwendung von Polyplexen sind z.B. zu finden in dem Artikel von Godbey WT, Mikos AG. „Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes“. (J Control Release. 2001;72:115-125) und zu kationischen Liposomen (Lipoplexe) in Artikeln von Lee RJ, Huang L. „Lipidic vector systems for gene transfer“. (Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1997;14:173-206) und von Simoes S, Filipe A, Faneca H, Mano M, Penacho N, Duzgunes N, et al. „Cationic liposomes for gene delivery“. (Expert Opin Drug Deliv. 2005;2:237-254). Den Komplexsystemen liegt zu Grunde, dass sich unter physiologischen Bedingungen die positiv geladene Nukleinsäure und das negativ geladene Trägermaterial spontan zu nanoskaligen Partikeln aneinander anlagern ("self-assembly").

Das erfindungsgemäße Sprühsystem liefert einen neuen vielversprechenden Ansatz, um eine langanhaltende Genexpression zu erzielen. Durch die Bildung eines Films in Form eines genaktivierten Depotsystems, dessen lokale Applikation zu einem konstanten Nukleinsäurespiegel über einen definierten Zeitraum im Applikationsgebiet führen kann, werden vorteilhafte Eigenschaften erzielt. Dosierhäufigkeit und Dosismenge können dadurch verringert, unerwünschte Nebenwirkungen wie die Transfektion anderer Gewebe, sogenannte "Off-Target-Effekte", verhindert, unphysiologische Proteinspiegel und die Belastung des Patienten mit Nukleinsäure und Trägermaterial vermieden und die Patientenakzeptanz verbessert werden.

Wie oben ausgeführt, wird davon ausgegangen, dass das Verhältnis von PA zu PAI-1-Inhibitor einen Einfluss auf die Bildung von chirurgischen Adhäsionen und die Narbenbildung hat. In einer weiteren Ausführungsform wird daher ein Sprühsystem zur Verfügung gestellt, das als Wirkstoffe eine Kombination aus PA und PAI-1-Inhibitor bzw. diese codierende Nucleinsäuren enthält, wobei das Verhältnis von PA und PAI-1-Inhibitor im Bereich von 5:1 bis 1:5 liegt, bei Verwendung der entsprechenden Nucleinsäuren kann das Verhältnis so eingestellt werden dass am Zielort nach Expression ein Verhältnis von PA:PAI-1-Inhibitor von 5:1 bis 1:5 resultiert. Es wurde gefunden, dass bei Applikation einer solchen Kombination die Bildung chirurgischer Adhäsionen besonders wirkungsvoll unterdrückt werden kann.

Das erfindungsgemäße Sprühsystem zeichnet sich dadurch aus, dass bei Vermischen der beiden Komponenten sehr schnell das Polymer unter Bildung eines Films ausgefällt wird, wobei ggf. in einer oder beiden der Komponenten enthaltene Wirkstoffe gleichzeitig in den Film mit integriert werden. Dazu werden die beiden Komponenten, die vor der Anwendung in getrennten Behältern aufbewahrt werden, so versprüht, dass sie beim Versprühen

- 22 -

oder direkt davor vermischt bzw. während des Vermischens versprüht werden. Die beiden Komponenten des erfindungsgemäßen Sprühsystems werden somit zur Applikation vermischt. Dies erfolgt bevorzugt, indem die beiden voneinander getrennten Komponenten zum Versprühen in eine Mischkammer geführt werden und direkt daraus versprüht werden. Bevorzugt wird zum Versprühen eine Vorrichtung verwendet, wie sie an sich bekannt ist, bei der bei Betätigung des Sprühventils aus zwei Vorratskammern jeweils eine Dosis in eine Mischkammer geführt und von dort gemeinsam versprüht wird. Auf diese Weise erfolgt die Vermischung direkt im Sprühapplikator beim Versprühen, wodurch eine vorzeitige Ausfällung, die die Sprühdüse verstopfen könnte, vermieden wird. Ein aufeinanderfolgendes Versprühen der beiden Komponenten aus getrennten Sprühapplikatoren kann keinen Film hoher Güte erzeugen. Es ist für die Erfindung wesentlich, dass die beiden bis zur Verwendung getrennt gehaltenen Komponenten direkt beim Versprühen miteinander in Kontakt kommen, sodass sich dann beim Auftreffen des Sprühnebels der durch Ausfällen des Polymers gebildete Film am Zielort ablagern kann. Sprühapplikatoren, die zur Vermischung/Versprühung von zwei vorher getrennt gehaltenen Komponenten geeignet sind, sind im Stand der Technik bekannt. Eine bekannte und für die Applikation gemäß der vorliegenden Erfindung geeignete Vorrichtung ist in Figur 8 dargestellt und ist als Spray Set von der Firma Baxter erhältlich.

Die jeweils abzugebende Dosis der beiden Komponenten kann eingestellt werden. Sie richtet sich nach der Art der Verwendung, der Art der Komponenten, ggf. dem Wirkstoff. Die beiden Komponenten sollten bei der Applikation in einem Verhältnis (bezogen auf das Volumen der Lösungen/Flüssigkeiten) von 10:90 bis 90:10, bevorzugt 25:75 bis 75:25 und bevorzugter in einem Verhältnis von 40:60 bis 60:40 vermischt werden. Die für den zu erzeugenden Film abgegebene Menge der Komponenten hängt ab von der erwünschten Größe und Dicke des Films. Sie kann in an sich bekannter Weise eingestellt werden. Zur Applikation im Bauchraum hat sich eine Menge von jeweils 0,5 bis 5 ml, bevorzugt 0,7 bis 3 ml jeder Komponente als geeignet erwiesen.

Als besonders vorteilhafte Formulierungen erwiesen sich folgende Kombinationen:
lipophile Komponente: 10 %ige (m/v) PLGA-Lösung (Resomer[®] RG H-Serie) in Glycerol-formal, Tetraglykol oder DMI,

hydrophile Komponente: Wasser für Injektionszwecke

Wirkstoffkomponente: pDNA/l-PEI Polyplexe, als Lyophilisat in der hydrophilen Phase gelöst (Einbettungsvariante A) oder mittels Homogenisator in der lipophilen PLGA-Lösung dispergiert (Einbettungsvariante B).

ggf. Saccharose mit einer Konzentration von 10% (m/v) als Kryoprotektor für die Lyophilisierung

Das erfindungsgemäße Sprühsystem wird bereitgestellt zur therapeutischen Anwendung. Einsatzgebiet für damit erzeugte Matrixsysteme ist die Verhinderung postoperativer Adhäsionen, bei denen es nach Operationen im Bauchraum, ausgelöst durch ein Ungleichgewicht zwischen dem gewebespezifischen Plasminogenaktivator und dessen Inhibitor, zu permanenten Verwachsungen kommen kann [56, 64, 65]. Kritisch ist dabei ein Zeitfenster von 2 Wochen, das eine akute Phase von 2-5 Tagen nach der Operation umfasst. Besonders geeignet sind Depotsysteme, die ein für tPA kodierendes Plasmid als Wirkkomponente enthalten. Neben der pharmakologischen Wirkkomponente stellt der Polymerfilm zusätzlich eine antiadhäsive Barriere gegen Verwachsungen dar. Möglich ist z.B. auch das Versprühen des erfindungsgemäßen Sprühsystems über Endoskop, z. B. bei einem endoskopischen Eingriff in der Bauchhöhle.

Die Erfindung wird in den beigefügten Figuren weiter erläutert.

Dabei zeigen die Figuren Ausführungsformen der Erfindung und Resultate, die mit ihnen erhalten wurden.

Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung zur Pathogenese von chirurgischen Adhäsionen

Figur 2 zeigt Diagramme, die die Filmgüte ausgewählter Resomer[®] RG Polymere im Vergleich zeigen: A) PLGA 50:50, H-Serie, B) PLGA 75:25, S-Serie. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an eingesetztem Polymer, der den Sprühfilm ausbildet, wohingegen der Rest als löslicher Anteil im Überstand verloren geht. Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (n=4) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**)).

Figur 3 zeigt Diagramme, die die Ergebnisse von viskoelastischen Untersuchungen der Filme darstellen: A) Speichermodul (G'), B) Verlustmodul (G'') der Resomer[®] RG H-Serie mit unterschiedlichen Lösungsmitteln im Vergleich bei einer Frequenz von 1 Hz.

Figur 4 zeigt die Filmgüte, die mit den getesteten Lösungsmitteln erhalten wird: A) *In situ* gebildete Filme unter Verwendung von Resomer[®] RG 503 H, B) Filmgüte gegen den Verteilungskoeffizienten P aufgetragen. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus n=4 Ansätzen dargestellt.

Figur 5 zeigt LD₅₀-Werte der getesteten Lösungsmittel im Vergleich: LD₅₀ der getesteten Lösungsmittel in Abhängigkeit von der Inkubationszeit auf Mesothelzellen. Bestimmt wurde jeweils die metabolische Zellviabilität mittels ATPlite Assay

Figur 6 zeigt Diagramme zur Freisetzungskinetik unterschiedlicher Formulierungen *in situ* gebildeter Filme: (A) Resomer[®] RG 502 H, Polyplexe in hydrophiler Phase, (B) Resomer[®] RG 502 H, Polyplexe in lipophiler Phase, (C) Resomer[®] RG 504 H, Polyplexe in hydrophi-

ler Phase, (D) Resomer[®] RG 504 H, Polyplexe in lipophiler Phase. Lyophilisierte Polyplexe wurden unter Verwendung unterschiedlicher Polymerlösungen (DMI (●), Tetraglykol (○) und Glycerolformal (▼) in die Filme eingebaut und die Freisetzung der pDNA über 30 Tage analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes (n=3) angegeben.

Figur 7 zeigt die Transfektionseffizienz lyophilisierter l-PEI/pDNA Polyplexe auf Lungenzelllinien unter Verwendung unterschiedlicher Kryoprotektoren. DNA Topologie - Lyophilisierte pDNA/l-PEI Polyplexe wurden aufgetrennt mittels Agarosegelelektrophorese unter Zusatz von Heparansulfat (HS). Die Polyplexe wurden hierzu in Wasser für Injektionszwecke (Wfi) resuspendiert. Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung ((a) n=7, (b) n=4)) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**)). pCMV-Luc Kontrolle (C), Größenmarker (L), Wasser für Injektionszwecke (Wfi), Ultra-Turrax[®] (UT), Homogenisator (H).

Figur 8 zeigt einen Versuchsaufbau zur Herstellung in situ gebildeter Filme

Figur 9 zeigt ein Diagramm mit Ergebnissen für die In vitro Applikation von erfindungsgemäßen Filmen auf Mesothelzellen: Luziferase Genexpression nach Applikation Resomer[®] RG 504 H basierter Filme auf Mesothelzellen. Plasmid DNA/l-PEI Polyplexe wurden in die hydrophile Phase eingebaut und die Expression über einen Zeitraum von 29 Tagen mittels Luziferaseassay untersucht. Gemessen wurden die emittierten Photonen (RLU) über 10 s nach Hintergrundkorrektur. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM (n=3) angegeben.

Figur 10 zeigt Ergebnisse für die In vitro Applikation in situ gebildeter Filme auf Mesothelzellen. (A) Matrixfreisetzung aus Resomer[®] RG 504 H basierenden Filmen und (B) Fluoreszenzaufnahme der eingebetteten Plasmid-DNA nach Anfärbung mit Propidiumiodid. pCMV-tPA-IRES-Luc/l-PEI Polyplexe wurden in der hydrophilen Phase gelöst, der Sprühfilm auf Mesothelzellen aufgesprüht und der tPA-Spiegel über einen Zeitraum von 29 Tagen mittel ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM (n=3) angegeben.

Figur 11 zeigt Kotransfektion von Plasmid-DNA/siRNA auf Mesothelzellen: a) PAI-1 und tPA Detektion im Western Blot nach 48h, b) tPA/PAI-1-Verhältnis in Abhängigkeit der Zeit. Die Polyplexe bestehend aus pCMV-tPA-IRES-Luc (ptPA) oder einem Platzhalter-Plasmid (pUC) und verschiedenen siRNAs (PAI-1, EGFP) wurden mit l-PEI bei einem N/P-Verhältnis von 10 (bezogen auf die pDNA Menge) in HBS hergestellt. Zum Vergleich ist die Expression unbehandelter Zellen (UN) dargestellt. Die Bestimmung der tPA- und PAI-1-Spiegel erfolgte mittels Western Blot im Überstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

- 25 -

Figur 12 zeigt eine schematische Darstellung des pCMV-tPA-IRES-Luc Plasmids

Figur 13 zeigt eine Verdünnungsreihe von l-PEI/pDNA Polyplexen in PBS

Figur 14 zeigt eine Standardkurve des humanen tPA-Antigenassays

Figur 15 zeigt die Transfektionseffizienz pulverförmiger Polyplexe bei Verwendung unterschiedlicher Kryoprotektoren.: Transfektionseffizienz lyophilisierter l-PEI/pDNA Polyplexe auf Lungenzelllinien unter (A) Verwendung unterschiedlicher Kryoprotektoren (10 % (m/v) Saccharose oder Mannose, 4 % (m/v) Dextran 5000, B) nach Homogenisierung lyophilisierter Polyplexe unter Verwendung von 10 % (m/v) Saccharose als Kryoprotektor.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert, ohne sie dadurch in irgendeiner Weise zu beschränken:

Beispiel 1

MATERIAL UND METHODEN

Nukleinsäuren

Das Plasmid pCMVLuc, das erhältlich ist, wie in [19] beschrieben, enthält das Luziferase-Gen (Luc) der Feuerfliege *Photinus pyralis* unter der Kontrolle des CMV-Promotors, einem Promotor aus dem Cytomegalievirus. Das Konstrukt pMetLuc kodiert ebenfalls unter der Kontrolle des CMV-Promotors für das Luziferase-Gen des Ruderflussskreb *Metridia longa*, ein sezerniertes Luziferase-Enzym [20].

Das Konstrukt pCMV-tPA-IRES-Luc wurde kloniert und ist in Figur 12 schematisch dargestellt. Es enthält neben den Sequenzen für das Luziferase-Enzym (Luc) und den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPA) einen CMV-Promotor (CMV-IE, Cytomegalievirus-immediate-early)

Die Klonierung des pCMV-tPA-IRES-Luc Plasmids erfolgte unter Verwendung des pIRES-Luc Vektor [21]. In diesen Vektor wurde eine für den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPA)-kodierende Sequenz unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen MluI und FseI (New England Biolabs Inc., USA) hinein kloniert. Hierzu wurde die Sequenz (Insert) aus dem Plasmid pCMV-tPA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert [22]. Der pIRES-Luc Vektor enthielt neben dem Luziferase Gen eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), die eine Translation beider Transkripte unabhängig voneinander ermöglichte.

Als Kontrollplasmid wurde pUC21 Vektor (Invitrogen, Deutschland), der keine Expressionskassette sondern lediglich das bakterielle Rückgrat enthält, eingesetzt.

Es wurden die folgenden Oligonukleotide synthetisiert: Es wurde eine siRNA gegen den Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1, 5'-GGAACAAGGAUGAGAUCAG[4, 23]-3')

- 26 -

und als Kontrolle eine siRNA gegen EGFP (5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU[dT][dT]-3') verwendet. Die lyophilisierten Proben wurden in Resuspensionspuffer (Quiagen) zu 20 µM beziehungsweise für die Freisetzungsstudien zu 100µM Stocklösungen gelöst, 1,5 min bei 90 °C inkubiert, 1 h bei 37 °C leicht geschüttelt und bei – 20 °C in Aliquoten gelagert.

Polyethylenimin

Lineares Polyethylenimin mit einer Molmasse von 22 kDa wurde nach einer Vorschrift von Plank und Kollegen synthetisiert [24]. Lineares PEI wurde analog der Vorschrift durch saure Hydrolyse des Propionsäureamids Poly(2-ethyl-2-oxazolin) 50 Da gewonnen, wobei die freigesetzte Propionsäure als azeotropes Gemisch dem Syntheseansatz stetig entzogen wurde, so dass die Reaktion nahezu vollständig ablaufen konnte. Die freie Base wurde anschließend mittels Natronlauge bei pH 12 ausgefällt, gewaschen und lyophilisiert. Das lyophilisierte l-PEI wurde bei 4 °C gelagert und nach Bedarf in destilliertem Wasser gelöst, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, dialysiert (ZelluTrans Dialysiermembranen T2, MWCO 8-10 kDa) und steril filtriert.

Die Quantifizierung der PEI-Lösung erfolgte photometrisch mittels Kupfersulfat-Methode bei 285 nm an einem Spektralphotometer (Ultrospec 3100 Pro) [25]. Als Referenz wurde eine l-PEI Charge bekannter Konzentration eingesetzt. Die Reinheit des Syntheseprodukts wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (Bruker 250 MHz, Karlsruhe) überprüft. Die Messung der Molmasse erfolgte mittels Gel-Permeations-Chromatographie mit einem Mehrwinkel-Laser-Streuungsdetektor (GPC-MALLS) und ergab eine Molmasse von 20-22 kDa.

PLGA Polymere

Für die Herstellung der Filme wurden folgende Polymere der Firma Boehringer Ingelheim, Deutschland verwendet:

- Resomer[®] RG 502, 503 und 504 H
- Resomer[®] RG 752, 755 S

Zelllinie

Es wurden pleurale Mesothelialzellen (human), kurz Met5A, von ATCC, Deutschland (CRL-9444) verwendet. Die Zelllinie wurde in einer 1:2 Mischung aus M199 (Gibco-BRL, Großbritannien) und MCDB 105 (Sigma-Aldrich, Deutschland) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Neben 10 % fötalem Kälberserum (PPA Laboratories, Österreich) wurde dem Medium ein epidermaler Wachstumsfaktor (5 ng/ml, Sigma-Aldrich, Deutschland) und Hydrocortison (400 ng/ml, Sigma-Aldrich, Deutschland) zugesetzt [26]. Ferner wurden die Zellen bei einer Konfluenz von circa 80 % passagiert und bis zu einer Passage von 20 für Versuche eingesetzt.

Herstellung der Polyplexe

Die Herstellung der Komplexe erfolgte spontan durch elektrostatische Bindungskräfte, wobei die Eigenschaften der gebildeten Polyplexe dabei im Wesentlichen von der Ionenstärke des Mediums, den verwendeten Polymeren und dem N/P-Verhältnis abhing. Diese gibt den molaren Stoffmengenquotienten aus protoniertem Stickstoffatom (N) der Polymerstruktur zum negativ geladenen Phosphatatom (P) in der Nukleinsäure an. Um kleine monodisperse Partikel zu erhalten, wurden gleiche Volumina der Lösung mit der geringeren Ladungsdichte, der Nukleinsäure-Lösung, zur Lösung mit höherer Ladungsdichte, der Polymer-Lösung, pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren (5-8 mal) gemischt. Die Lösung wurde anschließend bei RT für 20 min inkubiert bevor weitere Versuche durchgeführt wurden. Als Medium wurde Wasser für Injektionszwecke (siRNA, Plasmid-DNA Lyophilisate) und HBS pH 7,4 (Plasmid-DNA Liquid) eingesetzt.

Herstellung und Charakterisierung pulverförmiger Polyplexe

Die Polyplexe wurden unter Verwendung von pCMVLuc und l-PEI bei einem N/P-Verhältnis von 10 wie oben beschrieben in Wasser für Injektionszwecke hergestellt. Zur Testung unterschiedlicher kryoprotektiver Stoffe wurden die Polyplexe nach der Inkubationszeit mit einer 20 %igen (m/v) Saccharose-Lösung, einer 20 %igen (m/v) Mannose-Lösung oder einer 4 %igen (m/v) Dextran 5.000 Lösung 1:2 verdünnt, gemischt und aliquotiert. Diese konnten anschließend in Stickstoff schockgefroren und circa 24 h bei maximaler Leistung in der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert werden. Die Lyophilisate wurden zu einer finalen Konzentration von 0,02 µg/µl (gleiche Ausgangskonzentration) in dem jeweiligen Medium resuspendiert und eine Transfektion auf BEAS-2B Zellen in 96-Well-Platten analog wie unten beschrieben durchgeführt.

Saccharose wurde in Pulverform nach einer Inkubationszeit von 10 min zugegeben und die Komplexe weitere 10 min inkubiert, wobei vor und nach Zugabe von Saccharose die Partikelgröße mittels PCS kontrolliert wurde. Nach Lyophilisation konnte das Pulver in einem Mörser mit Pistill homogenisiert und anschließend mittels Homogenisator, einem zylindrischen Glasgefäß mit Glas-Pistill (Schütt Labortechnik, Deutschland), oder mittels Ultra-Turrax® (Stufe 3, 14 sec, Ika Labortechnik, Deutschland) in der PLGA-Lösung suspendiert werden. Alternativ dazu wurde das Pulver direkt oder vorher mittels Mörser homogenisiert in Wasser für Injektionszwecke resuspendiert. Die Lyophilisate wurden zu einer finalen Konzentration von 0,02 µg/µl in dem jeweiligen Medium resuspendiert.

Bestimmung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials

Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Polyplexe erfolgte mittels Photonenkorrelationsspektroskopie in einer Halbmikro-Küvette mit 600 µl Polyplex-Lösung in bidestilliertem Wasser (0,02 µg/µl pDNA), die des Zeta-Potentials mittels elektrophoreti-

scher Lichtstreuung in einer Makro-Küvette mit 1,6 ml Polyplex-Lösung (0,02 beziehungsweise 0,1 µg/µl pDNA). Folgende Einstellungen wurden verwendet: 5 Messungen (Größenmessung), 5 Läufe à 10 Zyklen pro Probe (Zeta-Potential); Viskosität von Wasser (0,89 cP) beziehungsweise HBS (1,14 cP); Ref-Index 1,33; Dielektrizitätskonstante 78,5; Temperatur 25 °C. Die Berechnung des Zeta-Potentials erfolgte nach Smoluchowski. Die Auswertung der Größe erfolgte auf Basis einer Standardkurve. Das Gerät wurde mittels Polystyren-Latex-Partikeln mit einer Größe von 92 nm (Duke Scientific Cooperation, CA, USA) und der Zeta-Potentialreferenz BI-LC-ZRZ mit einer Ladung von +50 mV (Laborchemie, Wien, Österreich) in regelmäßigen Abständen überprüft.

Agarosegelelektrophorese

Durch Agarosegelelektrophorese lässt sich der Grad der Komplexierung der Nukleinsäure (Plasmid-DNA, mRNA) in Polyplexen bestimmen. Hierzu wurden Polyplexe wie oben beschrieben hergestellt, mit 6-fach konzentriertem Ladepuffer versetzt und jeweils 100 ng pDNA auf ein 0,8 %iges Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid (10 µg/100 µl) aufgetragen. Als Referenz wurde ein entsprechender Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 125 V für circa 1,5 h in 1x TAE-Puffer. Im Anschluss wurden die Banden der Nukleinsäure unter UV-Licht (360 nm) detektiert und mittels Gelkamera aufgenommen.

Im Agarosegel lässt sich eine unvollständige Komplexierung durch freie Nukleinsäure im Gel erkennen, wobei Polyplexe in der Geltasche verbleiben. Ferner kann je nach Intensität des Signals in der Geltasche ein Rückschluss auf den Grad der Kondensation gezogen werden. Dabei gilt, je schwächer die Bande, desto stärker wird die Nukleinsäure vom kationischen Polymer kondensiert. Die Zugabe eines Polyanions (0,1 µg Heparansulfat (HS)/µg pDNA, Inkubationszeit 45 min) verdrängte die Nukleinsäure aus dem Komplex und ermöglichte eine Integritätsprüfung (Topologie, Abbau) der Nukleinsäure.

Beispiel 2

Charakterisierung *in situ* gebildeter Filme

Bestimmung der Filmgüte in Abhängigkeit vom Biomaterial und Lösungsmittel

Um die Filmbildung in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel und dem Polymertyp näher charakterisieren zu können, wurden Sprühversuche in Petrischalen durchgeführt. Hierzu wurde eine 10 %ige (m/v) Polymerlösung im jeweiligen Lösungsmittel hergestellt und jeweils 1 ml Polymerlösung (Spritze 1) mit 1 ml Wasser für Injektionszwecke (Spritze 2) bei 1,5 bar versprüht. Eine Wartezeit von 5 min sollte eine vollständige Ausbildung der Matrix ermöglichen. Für die visuelle Betrachtung der Matrix wurde die wässrige Phase mit

Brillantblau G angefärbt und der Abstand zur Sprühfläche mit 11 cm eingestellt. Die weiteren Versuche wurden ohne Fixierung durchgeführt, da dadurch ein homogenerer Film erzielt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Figur 4 gezeigt.

Um die Matrixgüte besser beurteilen zu können, wurde der Überstand abgenommen und in einer Vakuumanlage (Speed-Vac, Dieter Piatkowski, Deutschland) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Analog dazu wurde die Matrix in einer Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT 2, LH Leybold, Deutschland) ebenfalls bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wodurch anschließend der prozentuale Anteil des Polymers im Überstand (Verlust) und im Präzipitat (Matrixgüte) bezogen auf die Gesamtmenge an eingesetzten Polymer ermittelt werden konnte.

Bestimmung der Gewebeverträglichkeit des Lösungsmittels

Die Zytotoxizität der Lösungsmittel wurde mittels eines auf ATP-basierenden Testassays (ATPlite, Perkin Elmer) bestimmt. Hierzu wurden Zellen 24 h vor dem Versuch in eine 96-Well-Platte ausgesät, unmittelbar vor dem Versuch das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 50 µl serumhaltiges Medium mit Antibiotikazusatz (Penicillin/Streptomycin 0,1 % (v/v); Gentamycin 0,5 % (v/v), Gibco-BRL, Großbritannien) vorgelegt. Daraufhin wurden jeweils 50 µl unterschiedlicher Konzentrationen an Lösungsmittel (16-500 µg/µl), verdünnt in Wasser für Injektionszwecke, zugegeben und unterschiedlich lange bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchte inkubiert (15, 30, 60, 221, 360 und 640 min). Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 50 µl PBS pro Well vorgelegt und die Zellviabilität gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte in einem Plattenreader (Wallac Victor2/ 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer Inc., USA), wobei die Lumineszenz unbehandelter Zellen (50 µl Wasser für Injektionszwecke) als Referenzwert mit einer Viabilität von 100 % verwendet wurde. Für jeden Zeitpunkt wurde die Konzentration des Lösungsmittels gegen die gemessene Zellviabilität (Mittelwerte ± Standardabweichung aus n=4 Ansätzen) aufgetragen und eine nicht-lineare Standardfunktion angepasst:

$$y = \min + [(\max - \min) / (1 + (x/EC50)^{\text{Hilfslope}})]$$

Diese Funktion ergab für alle Lösungsmittel eine gute Anpassung: Tetraglykol (R² = 0,9181-0,9900), Glycerolfomal (R² = 0,9268-0,9945), Dimethylisosorbid (R² = 0,9647-0,9894). Die LD₅₀ Werte wurden den Schätzwerten der geplotteten Regressionskurve entnommen. Es handelt sich dabei um die Konzentration, bei der noch 50 % Zellviabilität gemessen werden konnte.

Viskoelastische Eigenschaften in situ gebildeter Filme

Um eine Vorstellung über die viskoelastischen Eigenschaften der Matrix zu erhalten, wurden rheologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden die Filme auf die Platte eines Rotationsviskosimeters (Physica MCR 301) aufgesprüht und die Biomaterialien (Resomer[®] RG 504 H und 502 H) in einem dynamischen Scherexperiment in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel getestet. Hierbei wird eine harmonisch oszillierende Scherspannung mit definierter Amplitude und Frequenz an eine Probe angelegt und die resultierende Scherverformung bestimmt, die durch zwei Antwortgrößen, die Antwortamplitude und die Antwortfrequenz, auch Phasenverschiebung genannt, charakterisiert ist. Beide Antwortgrößen können mathematisch in das Speichermodul G' und Verlustmodul G'' umgeformt werden, wobei das Speichermodul den gespeicherten und somit wiederverwertbaren Anteil der eingebrachten Bewegungs- beziehungsweise Verformungsenergie kennzeichnet (elastischer Anteil) und das Verlustmodul, ein Maß für die pro Schwingung in Wärme abgegebene Energie und somit verlorenen Anteil darstellt (reibungsbehafteter Anteil).

Versuche zur Bestimmung der Freisetzungskinetik

Die Versuche zur Ermittlung der Freisetzungskinetik wurden in verschließbaren Petrischalen (Petri dishes without absorbent 50x9mm, PALL) bei 37 °C unter ständigem Schütteln in einem Inkubator durchgeführt. Hierzu wurden die Proben wie oben mit Wasser für Injektionszwecke versprüht. Lyophilisierte l-PEI/pCMVLuc Komplexe (N/P-Verhältnis 10, 10 %ige Saccharose, 25 µg pDNA/Ansatz) wurden in homogenisierter Form (Mörser und Pistill) zuvor in der PLGA-Lösung dispergiert oder in der Wasserphase resuspendiert. Als Kontrolle wurde Wasser für Injektionszwecke eingesetzt. Nach dem Sprühen wurde 5 min gewartet, der Überstand abgenommen (0 h-Wert) und 1 ml PBS zugegeben. Der Überstand wurde daraufhin in regelmäßigem Abstand komplett ausgetauscht, wobei die Proben bis zur Analyse bei -20 °C gelagert wurden.

Die Quantifizierung der freigesetzten Plasmid-DNA aus der *in situ* geformten Matrix erfolgte photometrisch. Hierzu wurden die Proben vor der Vermessung mit Chloroform ausgeschüttelt (1 ml, 400 g, RT, 10 min), um PLGA Abbauprodukte abzutrennen, die eine photometrische Quantifizierung stören würden [27]. Die Proben wurden anschließend photometrisch bei 260 nm vermessen (Nanodrop-1000, PEQLAB Biotech, Deutschland). Im Vorfeld wurden l-PEI/pDNA Polypheze (pDNA-Konzentration 100 µg /ml) in Wasser für Injektionszwecke hergestellt und eine Standardreihe durch seriell Verdünnen mit PBS an 5 individuellen Tagen bei 260 nm ermittelt, an Hand derer anschließend die Konzentration an freigesetzter komplexierter Plasmid-DNA berechnet werden konnte. Die Ergebnisse sind in Figur 13 dargestellt. Als Kontrolle wurden unbeladene Filme untersucht (Hinter-

grundkorrektur), kleine Abweichungen in den Volumina wurden durch Auswaage der Proben über die Dichte von Wasser berücksichtigt.

Beispiel 3

In vitro Untersuchungen

Transfektionen

Zur Durchführung von *in vitro* Transfektionsstudien wurden 24 h vor der Transfektion 90.000 bis 120.000 Zellen (24-Well-Platte) pro Well ausgesät, wobei nur Zellen bis Passagen 20 für die Transfektion verwendet wurden. Dies resultierte in einer Konfluenz von circa 70 % am Tag der Transfektion. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 200 µl (24-Well-Platten) Medium ohne Serum vorgelegt. Im Anschluss wurden 50 µl der Polyplexe, entsprechend einer Plasmid-DNA Menge von 1 µg (24-Well-Platte) auf das vorgelegte Medium gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchte wurden die Polyplexe abgenommen, die Zellen erneut einmalig mit PBS gewaschen und durch serumhaltiges Medium mit Zusatz von Antibiotika (Penicillin/Streptomycin 0,1 % (v/v), Gentamycin 0,5 % (v/v), Gibco-BRL, Großbritannien) ersetzt.

Durchführung der Sprühversuche

L-PEI/Plasmid-DNA Polyplexe (N/P-Verhältnis 10, 100 µg pDNA/ Ansatz) wurden, wie oben beschrieben, formuliert, mit 10 % Saccharose lyophilisiert und mittels Mörser und Pistill homogenisiert, wodurch diese nach Gewicht dosiert und entweder in einer steril filterten PLGA-Lösung dispergiert oder in der Wasserphase (Wasser für Injektionszwecke) resuspendiert werden konnten. Wasser für Injektionszwecke ohne Zusätze wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Als Plasmid-DNA wurde pMetLuc und pCMV-tPA-IRES-Luc in gleichem Verhältnis verwendet.

3 Tage vor Beginn der Versuche wurden Met5A Zellen auf hängenden Einsätzen (1 µm PET Millicell) mit einer Polyethylenterephthalat-(PET)-Membran ausgesät, die eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen ermöglichten. Jeweils 1,5 ml Zellkulturmedium wurde vorgelegt, die Einsätze 2 min darin äquilibriert und anschließend 250.000 Zellen pro Well in 1,5 ml Medium auf der Membran ausgesät. Vor dem Versuch wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und die Proben, wie oben beschrieben, auf die Zellen aufgesprüht. Die Probenentnahme erfolgte zu Beginn täglich, später alle zwei bis drei Tage, wobei das Medium komplett gewechselt, die Proben sofort auf Eis gestellt und bei -80 °C bis zur analytischen Bestimmung gelagert wurden.

Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Luziferaseaktivitätsmessung

Zur Untersuchung der Gentransfereffizienz bei Einsatz des pCMVLuc Plasmids, welches für das Reporter-Gen Luziferase kodiert, wurde die Luziferaseaktivität 24 h nach der Transfektion gemessen, indem die Zellen einmal mit PBS gewaschen, pro Well mit 100 µl 1x Zelllysepuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,8, 0,01 % Triton-X 100) versetzt und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT für 60 sec geschüttelt wurden. Anschließend konnte zu einem Aliquot von 50 µl automatisch 100 µl Luziferin-Substrat (470 µM D-Luciferin, 270 µM Coenzym, 33,3 mM DTT, 530 µM ATP, 1,07mM (MgCO₃)₄Mg₂x5 H₂O, 2,67 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA 0,1 mM, 20 mM Tricin) zugegeben und die Lichtemission über einen Zeitraum von 5 sec in einem Plattenreader (Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer Inc., USA) vermessen werden. Vor Zugabe des Substrats wurde der Hintergrund ebenfalls über den Zeitraum von 5 sec bestimmt. Die Luziferaseaktivität, gemessen als emittierte Photonen (engl. *Relative Light Units*, RLU), wurden nach Hintergrundkorrektur über einen Zeitraum von 10 sec integriert und auf die Gesamtproteinmenge der Zellmasse bezogen. Das Gesamtprotein wurde zuvor mittels eines Standard Protein Assays (Methode nach Biorad) bestimmt.

Bestimmung der Transfektionseffizienz über die Expression der Metridialuziferase

Erste *in vitro* Sprühversuche wurden mit einer Mischung aus l-PEI/pMetLuc und l-PEI/pIRES-Luc-tPA Polyplexen durchgeführt. Das pMetLuc Plasmid kodiert für ein von der Zelle sezerniertes Luziferase-Enzym, die Metridialuziferase, und ermöglichte daher die Messung der Gentransfereffizienz über die Enzymexpression im Überstand der Proben. Diese Luziferase katalysiert die oxidative Decarboxylierung des Luziferins, in diesem Fall des Coelenterazins, unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von 482 nm. Zu ausgewählten Probenzeitpunkten wurden Proben mittels Ready-To-Glow Automation Kit (Clontech, A Takara Bio Company, Frankreich) untersucht, indem diese auf Eis aufgetaut und die Lichtemission über einen Zeitraum von 5 sec ohne vorheriges Verdünnen gemäß den Angaben des Herstellers in einem Plattenreader (Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer Inc., USA) vermessen wurden. Vor Zugabe des Substrats wurde der Hintergrund ebenfalls über den Zeitraum von 5 sec bestimmt, so dass die Luziferaseaktivität (RLU Werte) nach Hintergrundkorrektur über einen Zeitraum von 10 sec integriert und die jeweiligen Negativkontrollen von den Werten subtrahiert werden konnten. Unbehandelte Zellen dienten dabei als Negativkontrolle für die Bolusgabe (Einmalapplikation der kompletten pDNA Menge in Wasser für Injektionszwecke) und unbeladene Filme wurden als Negativkontrolle für die Matrixsysteme verwendet.

Bestimmung der Gesamtgewebeplasminogen Konzentration mittels ELISA

Als Zusatz zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurde die Gesamtgewebeplasminogen-Konzentration in ausgewählten Proben mittels ELISA (Human tPA Total Antigenassays, Innovative Research, Dunn Labortechnik GmbH, Deutschland) im Überstand der Zellen bestimmt, wobei mit dem eingesetzten Assay neben freiem und somit aktivem tPA auch die latente und an den Inhibitor gebundene Form detektiert wurde. Da es sich um Überstände aus der Zellkultur handelte, wurde der Standard analog den Proben in Zellkulturmedium der verwendeten Zellen ohne FCS verdünnt. Die Positivkontrolle (Bolusgabe) wurde wie folgt verdünnt: 1:50 (48 h, 9 d), 1:10 (16, 23 und 29 d). Die Proben aus dem inneren Kompartiment wurden aufgefüllt (30 µl Probe ad 100 µl), wohingegen die Proben aus dem äußeren Kompartiment unverdünnt analysiert wurden. Der Assay wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt und die Absorption bei 450 nm über einen Zeitraum von 0,1 sec in einem Plattenreader (Wallac Victor²/ 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer Inc., USA) gemessen. Die Standardkurve ist in Figur 14 dargestellt. Die Negativkontrollen wurden wie oben beschrieben verwendet.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Nach Beendigung des Sprühversuchs wurde das Medium entnommen und die in der Matrix verbliebene Plasmid-DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Hierzu wurde die Matrix mit Propidiumiodid in einer 1:10 Verdünnung in PBS 10 min bei RT inkubiert, vor der Aufnahme erneut mit PBS gewaschen und mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss, Jena, 10x Objektiv) Bilder aufgenommen. Die Anregung von Propidiumiodid erfolgte bei 470 ± 20 nm, wohingegen die Emission bei 540 ± 25 nm detektiert wurde. Für die Auswertung wurde die Software Axiovision LE 4.5 verwendet und mit einem Alexa 560nm Filter bei Brightfield analysiert.

Beispiel 4Kotransfektion von siRNA und Plasmid-DNA und Bestimmung des tPA/PAI-1-Verhältnis mittels Western Blot

Die Transfektion erfolgte wie oben in 24-Well-Platten mit einigen Besonderheiten. Es wurden jeweils 750 ng Plasmid-DNA und 30 pmol siRNA komplexiert mit l-PEI bei einem N/P-Verhältnis von 10 (bezogen auf die Plasmid-DNA Menge) eingesetzt. Der Wechsel des Mediums erfolgte nach 6 h. Die Proteine, der gewebespezifische Plasminogenaktivator und der Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), wurden nach der Transfektion mittels Western Blot analysiert. Da es sich um sezernierte Proteine handelte, konnten diese im Überstand der Zellen nachgewiesen werden, so dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 20 µl des Überstands der Zellen entnommen, die Proben pro Ansatz (n=3) gepoolt

- 34 -

und bei 14.000 rcf und 4 °C für 10 min zentrifugiert wurden, um tote Zellen abzutrennen. Die Proben wurden stets auf Eis gelagert und bis zur endgültigen Analyse bei -20 °C eingefroren.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer Molmasse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Um Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zu zerstören, wurden die Ansätze (3,75 µl Probe, 15 µl 4x Auftragspuffer (130mM Tris/HCl pH 7.4, 20 % Glycin, 10 % SDS, 0,06 % Bromphenolblau, 4 % DTT) ad 60 µl Wasser für Injektionszwecke) zuvor für 5 min bei 95 °C denaturiert. Jeweils 20 µl davon wurden mittels Elektrophorese auf einem 7,5 %igen Tris-HCl Gel (Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) aufgetrennt und mittels Elektrotransfer (1 h, 200 mA, Transferpuffer) auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Nach dem Blotting wurde die Membran zum Zwecke der Inkubation mit verschiedenen Primärantikörpern bei 50 Da geschnitten (Größenstandard, Precision Plus Protein Standards) und unspezifische Proteinbindungsstellen in einem Absättigungspuffer (5 % Milchkpulver in 20mM Tris/HCl pH 7.4, 137mM NaCl, 0,1 % Tween20) für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln blockiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln (Maus-Anti-alpha-Aktin 1:15.000 Chemicon, Deutschland; Maus-anti-huPAI-1 monoklonal 1:200 American Diagnostics, Deutschland; Maus-anti-hutPA monoklonal 1:400 Calbiochem, Deutschland in 1:10 verdünntem Absättigungspuffer). Zur Detektion wurde der sekundäre Antikörper (Ziege-anti-Maus HRP-konjugiert, Bio-Rad Laboratories, Deutschland) in einer 1:10.000 Verdünnung (tPA, PAI-1) beziehungsweise in einer 1:20.000 Verdünnung (Aktin) eingesetzt und die Membran für 1,5 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend konnten die markierten Proteine mittels ECL-Chemilumineszenz (Amersham Bioscience, USA) auf einem Film (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Deutsch) detektiert und zur Quantifizierung mittels Image J Basics Version 1.38 analysiert werden. Die Normalisierung erfolgte über die Aktinbande der unbehandelten Zellen.

Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind, falls nichts anderes angegeben, als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei $\alpha = 0,05(*)$ beziehungsweise bei $\alpha = 0,01(**)$ angenommen.

Entscheidend für die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels waren i) die pharmazeutische Anwendbarkeit, ii) eine gute Gewebeverträglichkeit, iii) die Wassermischbarkeit und iv) die Löslichkeit des Polymers im Lösungsmittel. Auf Basis dieser Parameter wurden einige Lösungsmittel für ein weiteres Screening ausgewählt.

Ein weit verbreitetes Lösungsmittel für die Anwendung injizierbarer Depotsysteme ist Tetraglykol (Tetrahydrofurfurylalkohol-Polyethylenglykol), auch als Glykofurol bezeichnet [28, 29]. Tetraglykol wird bereits seit den 60er Jahren als Lösungsmittel für Parenteralia (i.v., i.m.) in Konzentrationen bis 50 % (v/v) verwendet und zeigt in dieser Verdünnung eine geringe Toxizität [30].

Glycerolformal ist ein geruchloses Lösungsmittel mit ebenfalls geringer Toxizität, das aus einer Mischung aus 1,3-Dioxan-5-ol und 1,3-Dioxolan-4-methanol besteht [30] und ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für zahlreiche Pharmazeutika und Kosmetika darstellt. Heutzutage wird es vor allem in der Veterinärmedizin als Lösungsmittel für Injektionen verwendet. So ist Ivomec™ 0,27 % zur subkutanen Applikation in Schweinen zugelassen und wird mit 0,1 ml/kg eingesetzt [31].

Für Dimethylisosorbid (DMI) und Ethyl-lactat gibt es kaum Untersuchungen zur Verträglichkeit der Lösungsmittel. Ethyl-lactat wird als parenteral applizierbares Vehikel für Steroidformulierungen verwendend und gilt trotz GRAS-Nummer als relativ toxisch mit narkotischer und leicht hämolytischer Aktivität. DMI wird vorwiegend als Penetrationsverstärker topisch angewendet, wobei ebenfalls eine geringe hämolytische Aktivität beobachtet wurde [30, 34]. Ferner konnte in einer Studie von Matschke und Kollegen gezeigt werden, dass Glycerolester bei guter Verträglichkeit geeignete Lösungsmittel für PLGA/PLA Polymere darstellen [33]. Getestet wurde in diesem Zusammenhang Triacetin, ein kurzketziges Triglycerid mit geringer Toxizität [35, 36], das bereits zuvor als Alternative zu NMP und DMSO für *in situ* gebildete Depotarzneiformen beschrieben wurde [29, 37-39]

Bestimmung der Filmgüte in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel

Die entscheidende Voraussetzung für die Ausbildung eines *in situ* gebildeten Depotsystems ist die Löslichkeit des Polymers im Lösungsmittel. In der Literatur werden für *in situ* gebildete Systeme auf PLGA-Basis Löslichkeiten von mindestens 10 % (m/v) vorausgesetzt [40]. Löslichkeitsdaten in klassischen Lösungsmitteln wie NMP und DMSO, aber auch in Ethyl-lactat wurden bereits für unterschiedliche PLGA Polymere erhoben [41]. In diesen Studien zeigte sich, dass die Löslichkeit der Polymere mit steigender Molmasse abnahm. Ferner korrelierte die für eine *in situ* Präzipitation notwendige Wassermenge mit der Löslichkeit des Polymers im verwendeten Lösungsmittel. Je besser die Löslichkeit des Polymers im verwendeten Lösungsmittel war, desto mehr Wasser wurde für die Ausbildung der Depotmatrix benötigt. Im Gegensatz dazu nahm die notwendige Wassermenge mit steigendem Polymeranteil ab.

Erste Formulierungs- und Löslichkeitsversuche wurden unter Verwendung des Modellpolymers Resomer®RG 503 H durchgeführt. Zur besseren Visualisierung wurde die Wasser-

phase mit dem blauen Farbstoff Brillantblau angefärbt. Für alle getesteten Lösungsmittel ließ sich eine 10 %ige (m/v) Polymerlösung herstellen, allerdings zeigten die Filme bereits visuell deutliche Unterschiede bezüglich Festigkeit, Homogenität und Einbau der wässrigen Phase in die Matrix. Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt. Wie zu sehen ist, konnte unter Verwendung von Triacetin als Lösungsmittel kein homogener Film erzielt werden, sondern es bildete sich eine W/O Emulsion aus, die deutlich erkennbar ist. Alle anderen Lösungsmittel führten zur Ausbildung eines Films, wobei der Einbau der wässrigen Phase deutlich variierte. Anhand der Einfärbung der Matrix nahm der Einbau der wässrigen Phase in folgender Reihenfolge ab: Triacetin $\leq$ Ethyl-lactat $<<$ Tetraglykol $<$ Glycerolformal $\sim$ DMI.

Vergleicht man in Figur 4 den Einbau der wässrigen Phase in die Polymermatrix mit den LogP-Werten der einzelnen Lösungsmittel, so wird eine Abhängigkeit der Filmgüte, die durch einen geringen Verlust an Polymer im Überstand charakterisiert ist, von der Wasserlöslichkeit der verwendeten Lösungsmittel deutlich. Es ist davon auszugehen, dass Triacetin und Ethyl-lactat als lipophile Lösungsmittel ($X_{\log P} > 0$) eine geringere Wassermischbarkeit als die anderen Lösungsmittel aufweisen und dadurch die schlechte Filmgüte der Matrix erklärt werden kann. Diese Lösungsmittel kommen daher nur zur Lösung sehr lipophiler PLGA-Polymere in Betracht. Ggf. ist eine Mischung von Lösungsmitteln geeigneter. Während mit dem verwendeten Versuchsaufbau unter Verwendung von Triacetin kein Sprühfilm erzeugt werden konnte, führte Ethyl-lactat zu einer sehr inhomogenen, löchrigen Filmstruktur, in die nur sehr wenig Farbstoff eingebaut werden konnte. Im Gegensatz dazu bildeten sich bei Verwendung von Glycerolformal, DMI oder Tetraglykol *in situ* Filme aus. Aus diesem Grund sind, falls möglich solche Lösungsmittel mit einem $X_{\log P}$ -Wert von kleiner 0 bevorzugt.

Um die Filmgüte besser beurteilen zu können, wurde in Sprühversuchen die Menge an Polymer im Überstand (Verlust) und im Präzipitat (Implantat) durch Rückwaage der getrockneten Matrix quantifiziert. Trägt man nun den Verteilungskoeffizient P der Lösungsmittel gegen die Matrixgüte auf, wie in Figur 4B dargestellt, so ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Filmgüte von der Wassermischbarkeit des Lösungsmittels. Die Graphik zeigt deutlich, dass die Matrixbildung mit steigender Wassermischbarkeit der Lösungsmittel verbessert werden konnte, wobei mit einem P -Wert $< 0,25$ circa 80 % der eingesetzten Polymermenge in die Matrix eingebaut wurden.

Für die weiteren Versuche wurden unterschiedliche Polymere in Kombination mit den Lösungsmitteln Glycerolformal, DMI und Tetraglykol getestet. Triacetin wurde aufgrund der schlechten Filmbildung und Ethyl-lactat aufgrund von Instabilitäten und einer löchrigen, inhomogenen Filmstruktur und wegen seiner starken hämolytischen Aktivität nicht weiter untersucht.

Gewebeverträglichkeit der Lösungsmittel

Untersucht wurde weiterhin der Einfluss des Lösungsmittels auf die metabolische Zellviabilität über einen Zeitraum von 11 Stunden. Diese wird über den ATP-Wert der Zellen, ein Maß für die Viabilität, bestimmt. Bei akuter Toxizität von Substanzen sinkt der Wert rapide und ermöglicht somit eine Abschätzung der Gewebeverträglichkeit der Lösungsmittel. In Figur 5 sind die aus den Versuchen berechneten LD₅₀-Werte für alle getesteten Lösungsmittel in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt.

Die Verträglichkeit der Lösungsmittel nahm dabei in folgender Reihenfolge ab: Glycerolformal > > DMI > Tetraglykol. Glycerolformal wies mit einem LD₅₀-Wert von circa 1 g/ml bei einer Inkubationszeit unter 6 h von den getesteten Lösungsmitteln die geringste Toxizität auf. Im Vergleich zu DMI und Tetraglykol bedeutete dies eine 220-fach beziehungsweise 400-fach bessere Verträglichkeit nach Versuchsende.

Beispiel 5

Untersuchung von Biomaterialien

Als Biomaterialien wurden bioabbaubare Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Polymere, der Firma Boehringer Ingelheim untersucht (Handelsname Resomer RG®), die von der FDA bereits zur parenteralen Applikation zugelassen sind.

Matrixgüte in Abhängigkeit vom ausgewählten Polymer

Wie oben beschrieben variierte der prozentuale Polymeranteil, der in den Film eingebaut werden kann, in Abhängigkeit der Wasserlöslichkeit des verwendeten Lösungsmittels. Analog dazu sollte die Matrixgüte unter Verwendung verschiedener Polymere näher betrachtet werden. Da sich Tetraglykol für die getesteten Polymere nicht eindampfen ließ, liegen für dieses Lösungsmittel keine Daten vor. Figur 2 zeigt die Ergebnisse für Polymere mit einer Zusammensetzung von (a) PLA/PGA 50:50 mit freien Säuregruppen (H-Serie) und (b) PLA/PGA 75:25 mit veresterten Endgruppen (S-Serie). Letztere sind aufgrund des höheren Anteils an Milchsäure und den veresterten Endgruppen lipophiler als die H-Serie.

Die Graphiken verdeutlichen, dass mit höherer Molmasse der Polymere in beiden Serien eine größere Menge an Polymer in die Matrix eingebaut werden konnte. Dieser Effekt war signifikant für DMI in der H-Serie und für beide Lösungsmittel in der S-Serie, wobei unter Verwendung von Glycerolformal und Resomer® RG 755 S nahezu 100 % der eingesetzten Polymermenge die Matrix ausbildete (97,6±0,6 %).

Vergleicht man die Polymererien in Kombination mit den getesteten Lösungsmitteln miteinander, so zeigte Glycerolformal mit der S-Serie einen um 20 % geringeren Verlust an eingesetzter Polymermenge verglichen mit der H-Serie und verglichen mit DMI in beiden Polymererien. Erklärbar sind diese Ergebnisse erneut durch die unterschiedliche Wassermischbarkeit der beiden Lösungsmittel, die zu einer unterschiedlichen Löslichkeit der Polymere im Lösungsmittel führte und die Kinetik der Filmbildung maßgeblich beeinflusste. Während sich beide Serien sehr gut in DMI lösen ließen, konnte die S-Serie im Vergleich zur H-Serie nur schwer in Glycerolformal in Lösung gebracht werden. Letztere zeigte starkes Quellverhalten. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei der S-Serie in Glycerolformal um ein System nahe der Löslichkeitsgrenze handelte. Kombiniert mit der guten Wassermischbarkeit von Glycerolformal war eine schnelle und vollständige Filmbildung die Folge.

Viskoelastische Eigenschaften *in situ* gebildeter Filme

In einem dynamischen Scherexperiment wurden die viskoelastischen Eigenschaften der Filme untersucht. Hierzu wurde eine oszillierende Scherspannung mit einer definierten Amplitude und Frequenz an die Probe angelegt und die resultierende Scherverformung ermittelt, die ebenfalls durch Amplitude und Frequenz, auch Phasenverschiebung genannt, charakterisiert ist. Diese beiden Antwortgrößen können anschließend mathematisch in das Speichermodul G' und das Verlustmodul G'' umgeformt werden, wobei das Speichermodul den gespeicherten und somit wiederverwertbaren Anteil der eingebrachten Bewegungsbeziehungsweise Verformungsenergie kennzeichnet (elastischer Anteil) und das Verlustmodul ein Maß für die pro Schwingung in Wärme abgegebene Energie und somit den verlorenen Anteil darstellt (viskoser Anteil). In Figur 3 sind beide Module bei einer Anregungsfrequenz von 1 Hz für unterschiedliche Filme der H-Serie dargestellt.

Vergleicht man den elastischen und den viskosen Anteil beider Filme miteinander, so erkennt man eine unterschiedliche Sensitivität der viskoelastischen Eigenschaften gegenüber den verschiedenen Lösungsmitteln. Während sich im Falle der 502 H-Filme die viskoelastischen Eigenschaften durch die Wahl des geeigneten Lösungsmittels recht breit einstellen ließen (maximaler Faktor: 29 (G') beziehungsweise 22 (G'')), zeigten 504 H-Filme ein vom verwendeten Lösungsmittel unabhängiges rheologisches Verhalten. Letztere wiesen dabei mit 2-4 kPa eine mechanische Festigkeit vergleichbar mit Muskelfasern (8 -17 kPa) auf [46] und waren mit einem Verlustfaktor (G'/G'') > 1 vorwiegend elastisch dominiert, so dass sich diese Filme im Versuch ähnlich einem Festkörper verhielten. Einzige Ausnahme stellte DMI dar, dessen *in situ* Filme mit einem Verlustfaktor von 0,85 viskos dominiert waren. Mit einer Dicke von > 500 µm waren diese Filme im Vergleich zu den Resomer[®] RG 502 H-Filmen relativ dick (DMI: 500 µm, Glycerolformal: 600 µm, Tetraglykol:

- 39 -

800 µm). Letztere spreiteten auf der Platte des Rheometers und zeigten eine Dicke von lediglich 300 µm unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel.

Alle auf Resomer[®] RG 502 H basierenden Filme verhielten sich mit einem Verlustfaktor < 1 gelartig, wobei deutliche Unterschiede in der Festigkeit zwischen den Lösungsmitteln zu erkennen waren. Lediglich bei Verwendung von Tetraglykol konnte eine dem Resomer[®] RG 504 H vergleichbare Festigkeit der Filme bei einem Verlustfaktor von 0,79 erzielt werden. DMI und Glycerolformal waren mit einer Festigkeit von 130 beziehungsweise 900 Pa nicht annähernd vergleichbar und zeigten stark viskos dominiertes Verhalten (Verlustfaktor > 0,5).

Beispiel 6

Formulierung *in situ* gebildeter Filme

Basierend auf den Erfahrungen aus den bereits durchgeführten Sprühversuchen wurde eine Formulierung bestehend aus i) PLGA Polymer, gelöst in einem der drei bereits verwendeten Lösungsmittel, ii) wässriger Phase und iii) Plasmid-DNA als Modellwirkstoff entwickelt. Theoretisch konnte die Plasmid DNA sowohl in "nackter" als auch in komplexierter Form in die Matrix eingebaut werden. Da "nackte" Plasmid-DNA Zellen allerdings nur sehr ineffizient transfiziert, wurde die Plasmid-DNA vor der Einbettung in den Film mit L-PEI komplexiert (N/P-Verhältnis 10) und als nanoskalige Polyplexe in die Matrix eingebaut. Dadurch konnte diese zusätzlich vor einem pH-Abfall innerhalb der Matrix geschützt werden, der während des Abbaus der Polymerstruktur durch die Freisetzung von Polymer-Monomeren innerhalb der Matrix entsteht und generell ein Problem für empfindliche Makromoleküle darstellt [47].

Der Einbau der Polyplexe in die Matrix konnte gelöst in der wässrigen Phase [44] oder dispergiert in der PLGA-Lösung [28, 45] erfolgen. Allerdings hatte sich in Vorversuchen am Beispiel von PLGA/Tetraglykol-Systemen gezeigt, dass bereits eine direkte Zugabe kleiner Wassermengen (etwa 5 %) eine Präzipitation des Polymers verursachen konnte. Bei hohen Beladungen des Sprühfilms war daher der Einsatz hochkonzentrierter Plasmid-DNA Lösungen erforderlich, die allerdings eine geringe Stabilität aufweisen und zur Aggregatbildung neigen. Es war daher vorteilhaft die Polyplexe als Lyophilisat analog zu Proteinformulierungen [28, 45] in der PLGA-Lösung zu dispergieren oder vor Gebrauch in der wässrigen Phase zu resuspendieren. Grundsätzlich waren die Formulierungen wie folgt aufgebaut:

- 1) Lipophile Phase (1 ml): 10 % (m/v) PLGA Polymer in Glycerolformal, Tetraglykol oder DMI (Resomer[®] RG 502 H, 504 H)
- 2) Hydrophile Phase (1 ml): Wasser für Injektionszwecke

- 3) Wirkstoffkomponente: lyophilisierte Polyplexe resuspendiert in der lipophilen oder hydrophilen Phase

Herstellung pulverförmiger Polyplexe

Die Gefriertrocknung ist in der Pharmaindustrie eines der Standardverfahren zur Stabilisierung von Formulierungen während der Lagerung. Durch Einschluss der Moleküle in eine Hilfsstoffmatrix können Formulierungen dabei während der Trocknung stabilisiert werden, wobei je nach Trocknungsphase unterschiedliche Protektoren verwendet werden können. So verhindern Kryoprotektoren das Auskristallisieren der Lösung während des Einfrierens. Das System erstarrt als unterkühlte Schmelze ohne vollständige Phasentrennung (erstarrte Flüssigkeit, Glas). Im Gegensatz dazu bieten Lyoprotektoren Schutz im weiteren Verlauf der Trocknung, indem Sie unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken die Bindungen des Wirkstoffes zum Wasser ersetzen.

Polyplexe lassen sich unter Zusatz von Kryoprotektoren sowie Lyoprotektoren ebenfalls lyophilisieren, so dass eine Aggregatbildung nach der Resuspendierung verhindert werden kann [48, 49]. Als Lyophilisat können Polyplexe besser gelagert [48] und eine Aufkonzentrierung der Lösung bis zu einer Plasmid-DNA Konzentration von 1 mg/ml ermöglicht werden [50]. Zucker wie beispielsweise Saccharose oder Trehalose fungieren als Lyo- und Kryoprotektoren und haben sich zur Stabilisierung von Polyplexen als geeignet erwiesen [48, 49]. Wasserlösliche Substanzen wie diese können ferner die Freisetzung makromolekularer Wirkstoffe aus *in situ* geformten PLGA basierten Filmen beschleunigen. Während der Matrixbildung bilden sich durch Auflösung dieser Substanzen wassergefüllte Poren aus, durch die der Wirkstoff anschließend aus der Matrix diffundieren kann. Ein ähnlicher Effekt wurde für eine hohe Beladung der Matrix beschrieben [27, 33].

Getestet wurden verschiedene Zucker in standardmäßig eingesetzten Konzentrationen [48, 49]. Die Polyplexe, basierend auf l-PEI, wurden nach der Gefriertrocknung ohne vorherige Homogenisierung in Wasser für Injektionszwecke resuspendiert und deren Transfektionseffizienz auf humanen Bronchialepithelzellen getestet. Gute Transfektionsraten wurden in den eingesetzten Konzentrationen mit Disaccharid Saccharose mit einer 10-fachen Effizienzsteigerung gegenüber frisch hergestellten Polyplexen erzielt. Die Ergebnisse sind in Figur 15 gezeigt. Vergleichbare Werte wurden bereits von Talsma und Kollegen beschrieben [48], wobei osmotische Effekte, die zu einer gesteigerten Aufnahme der Partikel in die Zelle führen könnten, erst ab einer 2-fachen Aufkonzentrierung zu erwarten sind [50]. Partikelgrößenmessungen ergaben allerdings, dass es nach der Gefriertrocknung zu einer leichten Zunahme der Partikelgröße kam. Frisch hergestellte Partikel wiesen eine Partikelgröße von ~100 nm auf, wohingegen je nach verwendetem Dispergiermedium die Partikel nach der Gefriertrocknung bei einem $PI < 0,2$ auf 200-300 nm anwuchsen.

- 41 -

Um die pulverförmigen Polyplexe dosieren und in die Formulierung einarbeiten zu können, sollten diese nach der Lyophilisation im Mörser homogenisiert und mittels Ultra-Turrax (UT) oder Glashomogenisator (H) in der PLGA-Lösung dispergiert werden. Die Stabilität der Polyplexe nach Homogenisierung und anschließender Resuspendierung in Wasser für Injektionszwecke wurde mittels Transfektionsversuche und Agarosegelelektrophorese untersucht. Die Ergebnisse der Versuche auf Lungenzelllinien zeigten keine Veränderungen in der Transfektionseffizienz durch Homogenisierung (Figur 15B). Eine Kontrolle der Topologie der Plasmid-DNA unter Zusatz von Heparansulfat ergab ebenfalls keinen Unterschied zwischen den lyophilisierten Polyplexen in Wasser für Injektionszwecke (Figur 7).

Sowohl die in Wasser für Injektionszwecke resuspendierten Proben (unbehandelt) als auch jene Polyplexe, die vor der Resuspendierung vorhomogenisiert wurden (gemörsert), zeigten vergleichbare Bandenmuster für alle drei Dispergierungsmethoden (UT, Homogenisator, gelöst). Im Vergleich zur Kontrolle, unkomplexierter Plasmid-DNA, wurde in allen Fällen eine leichte Zunahme der relaxierten Form beobachtet. Ein Abbau der Plasmid-DNA war für Wasser für Injektionszwecke nicht zu erkennen.

Beispielhaft für die Lösungsmittel ist Glycerolformal dargestellt. Es ergaben sich keine Unterschiede im Bandenmuster zwischen unbehandelten oder vorhomogenisierten Proben sowie gegenüber der Wasserkontrolle. Unter Verwendung des Homogenisators als Dispergierungsmethode konnte ebenfalls keine Veränderung beobachtet werden. Im Falle des Ultra-Turrax verblieb die pDNA vorwiegend komplexiert in den Taschen des Gels, wobei für unbehandelte Proben zwei sehr schwache Banden vergleichbar mit den anderen Proben erkennbar waren. Allerdings ist anzumerken, dass bei Einsatz gleicher Mengen an Heparansulfat generell unter dem Einfluss von Glycerolformal größere Mengen an pDNA komplexiert in den Taschen verblieb. Für die homogenisierten UT-Proben war ein leichter Schmier im Gel zu erkennen, eine Zerstörung der Plasmid-DNA in Form von Fragmenten konnte allerdings auch hier nicht beobachtet werden.

Beispiel 7

Bestimmung der Freisetzungskinetik formulierter Plasmid-DNA Polyplexe

Die Wirkstofffreisetzung aus Implantaten kann prinzipiell durch i) Diffusion des Wirkstoffes aus der Polymermatrix (diffusionskontrolliert) oder ii) durch Erosion der Matrix (erosionskontrolliert) erfolgen [51, 52]. Für die Freigabe von Wirkstoffen aus bulkerodierenden Polymermatrices wie im Falle von PLGA- Systemen werden in Abhängigkeit der Wirkstoffbeladung, der Molmasse des verwendeten Polymers, sowie der Polymerkonzentration ein- oder zweiphasige Freigabeprofile beschrieben [53, 54].

Zusätzlich kann es initial bis zur vollständigen Präzipitation des Polymers zu einer Freisetzung des Wirkstoffes kommen. Die Freisetzungskinetik *in situ* gebildeter Filme wurde in Abhängigkeit der Molmasse des Polymers, des verwendeten Lösungsmittels und der Einbettungsvariante untersucht. Folgende Kombinationen wurden getestet:

1. Lipophile Phase (1ml): Resomer® RG 502 H oder 504 H 10 %ig (m/v) gelöst in Glycerolfomal, Tetraglykol oder DMI
2. Hydrophile Phase (1ml): Wasser für Injektionszwecke
3. Wirkstoffkomponente: lyophilisierte Polyplexe (l-PEI/pDNA) in homogenisierter Form

Die Polyplexe wurden nach der Lyophilisation im Mörser homogenisiert und entweder in der hydrophilen Phase resuspendiert (Einbettungsvariante A) oder mittels Homogenisator in der lipophilen PLGA- Lösung dispergiert (Einbettungsvariante B). Die Freisetzungsprofile sind für Resomer® RG 502 H und 504 H unter Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel für beide Einbettungsvarianten in Figur 6 dargestellt.

Es zeigen Diagramm (A): Resomer® RG 502 H, Polyplexe in hydrophiler Phase, Diagramm (B): Resomer® RG 502 H, Polyplexe in lipophiler Phase, Diagramm (C): Resomer® RG 504 H, Polyplexe in hydrophiler Phase, Diagramm (D): Resomer® RG 504 H, Polyplexe in lipophiler Phase.

Betrachtet man zunächst den Einbau der Polyplexe in den Film durch Lösung in der hydrophilen Phase, so zeigt sich ein deutlicher Einfluss der Molmassen der eingesetzten Polymere und der verwendeten Lösungsmittel auf die Freisetzungskinetik (Fig. 6 A, C). Ein Einbau der Wirkstoffkomponente war unter Verwendung von DMI als Lösungsmittel in Kombination mit dem kurzkettigen Polymer Resomer® RG 502 H nicht möglich (Fig. 6A). Während der Präzipitation des Polymers wurden bereits 100 % der Polyplexe freigesetzt. Unter Verwendung des längerkettigen Polymers, dem Resomer® RG 504 H, erreichte man hingegen einen typischen zweiphasigen Freisetzungsverlauf. Dieser war aus einer zunächst diffusionskontrollierten Freisetzung (Phase 1, konkaves Freisetzungsprofil) gefolgt von einer erosionskontrollierten Freisetzung (Phase 2, lineare Kinetik) zusammengesetzt (Fig. 6C). Auffällig war in diesem Zusammenhang, dass unter Verwendung von DMI in allen Fällen die höchste initiale Freisetzung erreicht wurde, die je nach Einbettungsvariante und Kettenlänge des Polymers von 10 % bis 100 % variierte.

Im Gegensatz dazu zeigte Glycerolfomal eine geringe initiale, gefolgt von einer langsamen diffusionskontrollierten Freisetzung. Erst mit beginnender Erosion der Matrixerosion wurde eine beschleunigte Freisetzung der Polyplexe beobachtet, die in Abhängigkeit der Kettenlänge der verwendeten Polymere nach 15 beziehungsweise 26 Tagen einsetzte. Filme auf Basis von Tetraglykol zeigten hingegen nach moderater initialer Freisetzung von

32 % (Resomer[®] RG 502 H) beziehungsweise 50 % (Resomer[®] RG 504 H) eine moderate bis keine Freisetzung im beobachteten Zeitrahmen. Lediglich im Falle des längerkettigen Polymers kam es bedingt durch die Erosion der Matrix zu einer geringen Freisetzung nach 26 Tagen (Fig. 6C).

Wurden die Polyplexe hingegen in der lipophilen PLGA- Lösung dispergiert (Einbettungsvariante B), waren die initialen Freisetzungsraten der Polyplexe, sowie die Diffusion aus der Matrix für alle Polymer/Lösungsmittel-Kombinationen reduziert und die Freisetzung verlief hauptsächlich erosionskontrolliert (Fig. 6B, D). Die getesteten Lösungsmittel zeigten dabei ähnliche Freisetzungskurven mit unterschiedlich starker Retardierung, wobei die Freisetzungsraten in folgender Reihenfolge zunahmen: Tetraglykol < Glycerolfomal < DMI. Während im Freisetzungsprofil für DMI und Glycerolfomal deutlich kürzere Erosionsraten für das kurzkettige 502 H-Polymer gegenüber dem langkettigen 504 H-Polymer erkennbar waren (Tag 17 *versus* Tag 29), konnte im Falle von Tetraglykol aufgrund der starken Retardierung der Matrix kein Unterschied zwischen den Polymeren (5,4 % *versus* 8,8 % kumulative Freisetzung nach 30 Tagen) beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigte DMI für alle Kombinationen aus lang -oder kurzkettigem Polymer und den verschiedenen Einbettungsvarianten die schnellste Freisetzung. Eine kontinuierliche Freisetzung bis zu 100 % Wirkstofffreisetzung konnte mit Resomer[®] RG 504 H durch Einbau der Wirkstoffkomponente in die hydrophile Phase erzielt werden. Polyplexe, die in Filmen auf Tetraglykol-Basis eingebaut wurden, zeigten keine diffusionskontrollierte Freisetzung. Über den beobachteten Zeitraum konnte nach initialer Freisetzung zusätzlich maximal 14 % der pDNA Menge freigesetzt werden, wobei die initiale Freisetzung zwischen 0 und 48 % variierte. Diese war im Falle von Einbettungsvariante A relativ hoch, wohingegen bei Dispergierung der Polyplexe in der lipophilen Phase keine initiale Freisetzung beobachtet wurde. Filme auf Basis von Glycerolfomal wiesen unabhängig vom Einbettungsverfahren eine geringe initiale Freisetzung auf, allerdings konnten die Polyplexe auch bei Einsatz dieser Filme erst nach 23 Tagen durch Erosion der Matrix freigesetzt werden.

Beispiel 8

Untersuchung der Transfektionseffizienz *in vitro*

Erste *in vitro* Freisetzungsprofile wurden wie oben beschrieben mit Hilfe des Reportergens Luziferase bestimmt. Basierend auf diesen Daten und den Anforderungen an die Arzneiform wurde das Polymer Resomer[®] RG 504 H in Kombination mit DMI als Lösungsmittel für den Film ausgewählt. Beide Wirkkomponenten sollten in lyophilisierter Form in die hydrophile Phase der Matrix eingebaut werden, wobei aus den Vorversuchen mit einer initialen Wirkstofffreisetzung von 55 % zu rechnen war. Diese erscheint für den Einsatz im

Bereich der postoperativen Adhäsionen durchaus sinnvoll, um die akute Phase nach der Operation (Tag 2-5) abzudecken [79-81], wobei eine unphysiologische Erhöhung der tPA-Konzentration aufgrund einer erhöhten Blutungsneigung im Peritoneum vermieden werden sollte. Alternativ wurde ein Film ohne initiale Freisetzung, aufgebaut aus Resomer® 504 H und Glycerolformal, getestet. Auch hier wurden die Polyphele in der hydrophilen Phase gelöst. Die Formulierungen wurden zunächst *in vitro* unter Verwendung der Wirkkomponente 1, die mit l-PEI komplexiert und unter Zusatz von 10 % Saccharose lyophilisiert wurde, untersucht. Als Kontrolle wurde in einer 1:1 Mischung zusätzlich das pMetLuc Plasmid, das für ein von der Zelle sezerniertes Luziferaseenzym kodiert, eingesetzt.

Für die *in vitro* Testung im Zellassay wurden Mesothelzellen (Met5A) auf Inserts angezüchtet und der Polymerfilm anschließend auf die Zellschicht aufgesprüht. Die Verwendung der Inserts ermöglichte die Aufteilung der Wells in ein Zweikammersystem mit äußerem und innerem Kompartiment vergleichbar mit der Anatomie vor Ort im Peritoneum, zwischen denen ein ständiger Stoffaustausch möglich war, sodass die Zellen von der apikalen und basolateralen Seite mit Medium versorgt werden konnten. Eine optische Kontrolle der Zellmorphologie erfolgte über Lichtmikroskopie, war allerdings durch den aufgesprühten Film erschwert. Die Expression des Reportergens Luziferase konnte durch Verwendung der Inserts in beiden Kompartimenten über einen Zeitraum von 30 Tagen untersucht werden.

Dargestellt ist in Figur 10 das obere Kompartiment. Im Vergleich zur Bolusgabe, bei der die gesamte Plasmid-DNA Dosis ohne Freisetzungssystem in Wasser für Injektionszwecke appliziert wurde, zeigten die *in situ* gebildeten Filme einen um den Faktor 10^3 bis 10^4 geringeren Spiegel an Luziferase. Der Verlauf der Genexpression erfolgte wie oben beschrieben. In diesen Studien zur Freisetzungskinetik hatten Filme auf DMI-Basis eine initiale Freisetzung von 56 % der eingesetzten pDNA Menge und im weiteren Verlauf eine Freisetzung von weiteren 38 % bis Tag 26 gezeigt. Diesem Freisetzungsprofil folgend wurde für den Film auf DMI-Basis eine erhöhte Genexpression bereits nach 2 Tagen beobachtet, die nach weiteren 7 Tagen auf Basalwerte abfiel und bis zum Tag 23 erneut auf moderate Werte anstieg. Im Gegensatz dazu verlief die Genexpression bei Verwendung von Glycerolformal als Lösungsmittel zweiphasig ohne initiale Freisetzung der Polyphele. Nach einem ersten moderaten Anstieg der Expressionsrate innerhalb der ersten 10 Tage konnte ein weiteres Maximum mit einer 2-fach gesteigerten Genexpression nach 23 Tagen detektiert werden. Niedermolekulare Fragmente im Zellkulturmedium deuteten auf eine beginnende Erosion hin.

Die tPA-Expression aus der Matrix bestehend aus Glycerolformal und Resomer® RG 504 H ist im Vergleich zur Einmalgabe und zu einem Film ohne Wirkstoffkomponente (inaktiver Film) in Figur 10A dargestellt. Für die Einmalgabe der Wirkstoffkomponente

ohne Depotsystem ergaben sich über den Zeitraum von 29 Tagen analog zur Luzifera-seexpression sehr hohe Proteinspiegel, wobei eine 100 bis 40-fache Zunahme der tPA-Konzentration gegenüber den Basalwerten erzielt werden konnte. Ähnliche Konzentrationen wurden nach intraperitonealer Gabe von rekombinantem tPA (Alteplase) im Plasma erreicht [82]. Die Werte, die mit Hilfe der Matrixformulierung erreicht werden konnten, erscheinen daher weit näher an den physiologischen Bedingungen. Für Plasma und Peritonealflüssigkeit sind freie tPA-Antigen-Konzentrationen von 4 bis 6 ng/ml beschrieben [82-84], wobei zusätzlich im Durchschnitt 1,3 ng/ml tPA an PAI-1 gebunden vorliegen [84]. Erstaunlich ist, dass schon durch Applikation des inaktiven Films die Werte leicht zunehmen, wobei zu Beginn der Freisetzung eine 4-fache Steigerung durch den aktiven Film (mit eingebetteter Wirkstoffkomponente) im Vergleich zum inaktiven erzielt werden konnte. Der Effekt nivellierte sich bis zum Tag 16 und die tPA-Spiegel sanken mit 2 ng/ml auf Basalwerte ab. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass bis zum Tag 15 kaum mehr Polyplexe aus der Matrix freigesetzt werden konnten (siehe Kapitel 7.3). Zu Versuchsende war diese nicht komplett erodiert, so dass eingebettete Polyplexe im Sprühfilm nachgewiesen werden konnten (Fig. 10 B).

Beispiel 9

Erhöhung der Gewebe-Plasminogenkonzentration durch Koapplikation von siRNA und pDNA

Die Steigerung der extrazellulären tPA-Konzentration durch Applikation eines für tPA kodierenden Plasmids konnte auf Mesothelzellen erfolgreich gezeigt werden. Inwiefern eine Zunahme des tPA/PAI-1-Verhältnisses durch gleichzeitige Applikation einer siRNA gegen PAI-1 erzielt werden kann, wird im Folgenden untersucht werden.

Frühere Studien hatten gezeigt, dass l-PEI vor allem für die *in vivo* Applikation von siRNA und Plasmid-DNA gut geeignet ist [23]. Daher wurden pDNA/siRNA/l-PEI Polyplexe bei einem N/P-Verhältnis von 10 (bezogen auf die pDNA-Konzentration) in HBS hergestellt und unterschiedliche siRNA Sequenzen gegen PAI-1 getestet. Das tPA/PAI-1-Verhältnis bei Applikation von unterschiedlichen pDNA/siRNA Kombinationen ist in Figur 11 dargestellt. Verwendet wurde die siRNA Sequenz, welche die PAI-1 Expression in Vorversuchen am effizientesten inhibierte (PAI-1 A), bei einer optimierten Konzentration von 0,12 µM. 48 h nach der Transfektion stieg das tPA/PAI-1-Verhältnis bei Koapplikation gegenüber unbehandelten Zellen auf das 8-fache an, wobei durch Applikation von pDNA alleine oder in Kombination mit einer nicht funktionellen siRNA (EGFP siRNA) lediglich eine Steigerung um das 4- beziehungsweise 5-fache erzielt werden konnte. Unter Verwendung eines Platzhalter-Plasmids (pUC) zeigte sich, dass die siRNA eine Erhöhung des tPA/PAI-1-Verhältnisses um den Faktor 2 bewirkte.

- 46 -

Beispiel 10

Die Entwicklung eines *in situ* gebildeten Films für die kontrollierte Freisetzung von Polyplexen erfolgte auf Basis eines Applikationssystems der Firma Baxter, wie in Figur 8 gezeigt. Das Zweispritzensystem wurde dazu mit einer lipophilen Komponente (Spritze 1), bestehend aus einem bioabbaubaren Polymer gelöst in einem organischen Lösungsmittel, und einer wässrigen Komponente (Spritze 2), Wasser für Injektionszwecke, beladen. Als Wirkstoffkomponente wurden lyophilisierte pDNA/l-PEI Polyplexe eingesetzt. Diese konnten anschließend in der lipophilen Phase dispergiert oder in der hydrophilen Phase gelöst werden. Beide Einbettungsvarianten wurden im Hinblick auf die Freisetzungskinetik wie oben untersucht.

Beispiel 11

Glycerolformal zeigte im Zellviabilitätstest die beste Verträglichkeit auf Mesothelzellen, wobei 200 beziehungsweise 400-fach höhere LD₅₀-Werte gegenüber DMI und Tetraglykol gemessen wurden. Diese lagen unter 6 h Inkubationszeit bei circa 1 g/ml, das heißt bei einer Applikation von circa 780 µl reinem Glycerolformal sterben 50 % der Mesothelzellen ab. Literaturdaten geben nach i.v. Gabe in Nagern für DMI und Glycerolformal vergleichbare LD₅₀-Werte an, wohingegen Tetraglykol um den Faktor 2-3 toxischer ist. Nach Herstellerangaben zu Ivomec[®], einem Tierarzneimittel gegen Parasiten, ist eine LD₅₀ von 4-4,8 g/kg Körpergewicht (Maus) bei i.v. Applikation einer 50 %igen Glycerolformallösung zu entnehmen. Ähnliches beschreibt die EMA in einem Abschlussbericht des Komitees für Veterinärprodukte [85]. Die akute Toxizität nach i.v. Gabe von DMI unterscheidet sich von Glycerolformal nur kaum. Mit einer LD₅₀ von 5,4 g/kg Körpergewicht (Ratte) bei Applikation von 40 % DMI in isotonischer Kochsalzlösung (v/v) und einer LD₅₀ von 6,9 g/kg Körpergewicht (Maus) bei Applikation einer 20 %igen Lösung scheint DMI nach i.v. Gabe noch besser verträglich. Tetraglykol wird als Lösungsmittel für Parenteralia (i.v., i.m.) bereits seit den 60er Jahren in Konzentrationen bis 50 % (v/v) verwendet und ist in dieser Verdünnung als nicht reizend eingestuft. Die LD₅₀ nach i.v. Gabe ohne Verdünnung liegt mit 3,8 g/kg Körpergewicht (Maus) niedriger als für die beiden anderen Lösungsmittel beschrieben [86].

REFERENZEN

- [1] Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N Engl J Med. 1990;323:570-578.
- [2] Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. J Gene Med. 2007;9:833-842.

- [3] Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Journal of Gene Medicine; 2009.
- [4] Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M, Brauchle C. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. Science. 2001;294:1929-1932.
- [5] Godbey WT, Mikos AG. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. J Control Release. 2001;72:115-125.
- [6] Lee RJ, Huang L. Lipidic vector systems for gene transfer. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1997;14:173-206.
- [7] Simoes S, Filipe A, Faneca H, Mano M, Penacho N, Duzgunes N, et al. Cationic liposomes for gene delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2005;2:237-254.
- [8] Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Pharmacokinetics of Plasmid DNA-Based Non-viral Gene Medicine. Adv Genet. 2005;53PA:47-68.
- [9] Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:581-593.
- [10] Pannier AK, Shea LD. Controlled release systems for DNA delivery. Mol Ther. 2004;10:19-26.
- [11] Elfinger M, Uezguen S, Rudolph C. Nanocarriers for Gene Delivery - Polymer Structure, Targeting Ligands and Controlled-Release Devices. Current Nanoscience. 2008;4:322-353.
- [12] Packhaeuser CB, Schnieders J, Oster CG, Kissel T. In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. Eur J Pharm Biopharm. 2004;58:445-455.
- [13] Hatefi A, Amsden B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. J Control Release. 2002;80:9-28.
- [14] Dadey EJ. The Atrigel Drug Delivery System. In: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, Lane ME, editors. Modified-release drug delivery technology. 2 ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2008. p. 183-190.
- [15] Chen G, Junnarkar G. Alzamer Depot Bioerodible Polymer Technology. In: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, Lane ME, editors. Modified-release drug delivery technology. 2 ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2008. p. 215-225.
- [16] Brodbeck KJ, DesNoyer JR, McHugh AJ. Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery. Part II. The role of solution thermodynamics and bath-side mass transfer. J Control Release. 1999;62:333-344.

- [17] Graham PD, Brodbeck KJ, McHugh AJ. Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery. *J Control Release*. 1999;58:233-245.
- [18] Fried I, Traitel T, Goldbart R, Shmilowitz D, Wolfson M, Kost J. Cancer gene therapy using pH-sensitive polyplexes released from an injectable PLGA implant. In: Society CR, editor. 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society Vienna, Austria: Controlled Release Society 2005. p. 598.
- [19] Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Mechtler K, Wagner E. Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconj Chem*. 1992;3:533-539.
- [20] Markova SV, Golz S, Frank LA, Kalthof B, Vysotski ES. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme. *J Biol Chem*. 2004;279:3212-3217.
- [21] Sakata Y, Yoshioka W, Tohyama C, Ohsako S. Internal genomic sequence of human CYP1A1 gene is involved in superinduction of dioxin-induced CYP1A1 transcription by cycloheximide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;355:687-692.
- [22] Sakamoto T, Oshima Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K. Target gene transfer of tissue plasminogen activator to cornea by electric pulse inhibits intracameral fibrin formation and corneal cloudiness. *Hum Gene Ther*. 1999;10:2551-2557.
- [23] Bonnet ME, Erbacher P, Bolcato-Bellemin AL. Systemic delivery of DNA or siRNA mediated by linear polyethylenimine (L-PEI) does not induce an inflammatory response. *Pharm Res*. 2008;25:2972-2982.
- [24] Orgris M, Wagner E. Linear polyethylenimine: Synthesis and transfection procedures for in vitro and in vivo. In: Friedman T, Rossi J, editors. *Gene Transfer: Delivery and Expression of cDNA and RNA, A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007. p. 521-528.
- [25] Ungaro F, De Rosa G, Miro A, Quaglia F. Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 2003;31:143-149.
- [26] Arbeiter K, Bidmon B, Endemann M, Bender TO, Eickelberg O, Ruffingshofer D, et al. Peritoneal dialysate fluid composition determines heat shock protein expression patterns in human mesothelial cells. *Kidney Int*. 2001;60:1930-1937.
- [27] Csaba N, Caamano P, Sanchez A, Dominguez F, Alonso MJ. PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery. *Biomacromolecules*. 2005;6:271-278.

- [28] Eliaz RE, Kost J. Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. *J Biomed Mater Res.* 2000;50:388-396.
- [29] Chern RZ, J. Liquid polymeric compositions for controlled release of bioactive substances. In: Patent U, editor. 2004.
- [30] Mottu F, Laurent A, Rufenacht DA, Doelker E. Organic solvents for pharmaceutical parenterals and embolic liquids: a review of toxicity data. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2000;54:456-469.
- [31] Lifschitz A, Pis A, Alvarez L, Virkel G, Sanchez S, Sallovitz J, et al. Bioequivalence of ivermectin formulations in pigs and cattle. *J Vet Pharmacol Ther.* 1999;22:27-34.
- [32] Cheng T, Zhao Y, Li X, Lin F, Xu Y, Zhang X, et al. Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *J Chem Inf Model.* 2007;47:2140-2148.
- [33] Matschke C, Isele U, van Hoogevest P, Fahr A. Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *J Control Release.* 2002;85:1-15.
- [34] Mottu F, Stelling MJ, Rufenacht DA, Doelker E. Comparative hemolytic activity of undiluted organic water-miscible solvents for intravenous and intra-arterial injection. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2001;55:16-23.
- [35] Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.* 2000;21:2475-2490.
- [36] Jain RA, Rhodes CT, Railkar AM, Malick AW, Shah NH. Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50:257-262.
- [37] Chandrashekar G, Udupa N. Biodegradable injectable implant systems for long term drug delivery using poly (lactic-co-glycolic) acid copolymers. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48:669-674.
- [38] Singh UV, Udupa N. In vitro characterization of methotrexate loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and antitumor efficacy in Sarcoma-180 mice bearing tumor. *Pharm Acta Helv.* 1997;72:165-173.
- [39] Bleiberg B, Beers TR, Persson M, Miles JM. Metabolism of triacetin-derived acetate in dogs. *Am J Clin Nutr.* 1993;58:908-911.
- [40] Dunn R, English J, Cowsar D, Vanderbilt D. Biodegradable in-situ forming implants and methods for producing the same. In: Patent U, editor. US1994.

- [41] Shively M, Coonts B, Renner W, Southard J, Bennett A. Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system. *J Control Release*. 1995;33:237-243.
- [42] Sitter T, Toet K, Quax P, Kooistra T. Fibrinolytic activity of human mesothelial cells is counteracted by rapid uptake of tissue-type plasminogen activator. *Kidney Int*. 1999;55:120-129.
- [43] Elfinger M, Maucksch C, Rudolph C. Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells. *Biomaterials*. 2007;28:3448-3455.
- [44] Eliaz RE, Szoka FC, Jr. Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants. *Gene Ther*. 2002;9:1230-1237.
- [45] Eliaz RE, Wallach D, Kost J. Delivery of soluble tumor necrosis factor receptor from in-situ forming PLGA implants: in-vivo. *Pharm Res*. 2000;17:1546-1550.
- [46] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126:677-689.
- [47] Capan Y, Woo BH, Gebrekidan S, Ahmed S, DeLuca PP. Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *J Control Release*. 1999;60:279-286.
- [48] Talsma H, Cherng J, Lehrmann H, Kursu M, Ogris M, Hennink WE, et al. Stabilization of gene delivery systems by freeze-drying. *Int J Pharm*. 1997;157:233-238.
- [49] Cherng JY, vd Wetering P, Talsma H, Crommelin DJ, Hennink WE. Stabilization of polymer-based gene delivery systems. *Int J Pharm*. 1999;183:25-28.
- [50] Anchordoquy TJ, Armstrong TK, Molina MC. Low molecular weight dextrans stabilize nonviral vectors during lyophilization at low osmolalities: concentrating suspensions by rehydration to reduced volumes. *J Pharm Sci*. 2005;94:1226-1236.
- [51] Fan L, Singh S. Controlled release: a quantitative treatment 1989.
- [52] Goepferich A. Mechanisms of polymer degradation and elimination. *Handbook of biodegradable polymers* 1997. p. 451-471.
- [53] Goepferich A, Sieh L, Langer R. Aspects of polymer erosion. *Materials Research Society Symposium Proceedings* 1995. p. 155-160.
- [54] Ramchandani M, Robinson D. In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from plga 50:50 implants. *J Control Release*. 1998;54:167-175.

- [55] Menzies D. Peritoneal adhesions. Incidence, cause, and prevention. *Surg Annu.* 1992;24 Pt 1:27-45.
- [56] Hellebrekers BW, Trimbos-Kemper TC, Trimbos JB, Emeis JJ, Kooistra T. Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation. *Fertil Steril.* 2000;74:203-212.
- [57] DeCherney AH, diZerega GS. Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. *Surg Clin North Am.* 1997;77:671-688.
- [58] Ellis H, Moran BJ, Thompson JN, Parker MC, Wilson MS, Menzies D, et al. Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. *Lancet.* 1999;353:1476-1480.
- [59] Parker MC, Ellis H, Moran BJ, Thompson JN, Wilson MS, Menzies D, et al. Postoperative adhesions: ten-year follow-up of 12,584 patients undergoing lower abdominal surgery. *Dis Colon Rectum.* 2001;44:822-829; discussion 829-830.
- [60] Holmdahl L, Risberg B. Adhesions: prevention and complications in general surgery. *Eur J Surg.* 1997;163:169-174.
- [61] Brokelman W, Holmdahl L, Falk P, Klinkenbijl J, Reijnen M. The peritoneal fibrinolytic response to conventional and laparoscopic colonic surgery. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2009;19:489-493.
- [62] Cheong YC, Laird SM, Li TC, Shelton JB, Ledger WL, Cooke ID. Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Hum Reprod Update.* 2001;7:556-566.
- [63] Ivarsson ML, Bergstrom M, Eriksson E, Risberg B, Holmdahl L. Tissue markers as predictors of postoperative adhesions. *Br J Surg.* 1998;85:1549-1554.
- [64] Treutner KH, Schumpelick V. [Prevention of adhesions. Wish and reality]. *Chirurg.* 2000;71:510-517.
- [65] Rout UK, Saed GM, Diamond MP. Expression pattern and regulation of genes differ between fibroblasts of adhesion and normal human peritoneum. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:1.
- [66] Kumar S, Wong PF, Leaper DJ. Intra-peritoneal prophylactic agents for preventing adhesions and adhesive intestinal obstruction after non-gynaecological abdominal surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009:CD005080.
- [67] Ahmad G, Duffy JM, Farquhar C, Vail A, Vandekerckhove P, Watson A, et al. Barrier agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008:CD000475.

- [68] Binda MM, Hellebrekers BW, Declerck PJ, Koninckx PR. Effect of Reteplase and PAI-1 antibodies on postoperative adhesion formation in a laparoscopic mouse model. *Surg Endosc.* 2009;23:1018-1025.
- [69] Farquhar C, Vandekerckhove P, Watson A, Vail A, Wiseman D. Barrier agents for preventing adhesions after surgery for subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000:CD000475.
- [70] Diamond MP. Reduction of de novo postsurgical adhesions by intraoperative precoat-ing with Sepracoat (HAL-C) solution: a prospective, randomized, blinded, placebo-controlled multicenter study. The Sepracoat Adhesion Study Group. *Fertil Steril.* 1998;69:1067-1074.
- [71] Gago LA, Saed GM, Chauhan S, Elhammady EF, Diamond MP. Seprafilm (modified hyaluronic acid and carboxymethylcellulose) acts as a physical barrier. *Fertil Steril.* 2003;80:612-616.
- [72] Mettler L, Audebert A, Lehmann-Willenbrock E, Schive K, Jacobs VR. Prospective clinical trial of SprayGel as a barrier to adhesion formation: an interim analysis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2003;10:339-344.
- [73] Dunn R, Lyman MD, Edelman PG, Campbell PK. Evaluation of the SprayGel adhe-sion barrier in the rat cecum abrasion and rabbit uterine horn adhesion models. *Fertil Steril.* 2001;75:411-416.
- [74] Fazio VW, Cohen Z, Fleshman JW, van Goor H, Bauer JJ, Wolff BG, et al. Reduction in adhesive small-bowel obstruction by Seprafilm adhesion barrier after intestinal resec-tion. *Dis Colon Rectum.* 2006;49:1-11.
- [75] Yagmurlu A, Barlas M, Gursel I, Gokcora IH. Reduction of surgery-induced perito-neal adhesions by continuous release of streptokinase from a drug delivery system. *Eur Surg Res.* 2003;35:46-49.
- [76] Yeo Y, Bellas E, Highley CB, Langer R, Kohane DS. Peritoneal adhesion prevention with an in situ cross-linkable hyaluronan gel containing tissue-type plasminogen activator in a rabbit repeated-injury model. *Biomaterials.* 2007;28:3704-3713.
- [77] Hill-West JL, Dunn RC, Hubbell JA. Local release of fibrinolytic agents for adhesion prevention. *J Surg Res.* 1995;59:759-763.
- [78] Ferland R, Mulani D, Campbell PK. Evaluation of a sprayable polyethylene glycol adhesion barrier in a porcine efficacy model. *Hum Reprod.* 2001;16:2718-2723.
- [79] diZerega GS, Campeau JD. Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Hum Reprod Update.* 2001;7:547-555.

- [80] Menzies D, Ellis H. The role of plasminogen activator in adhesion prevention. *Surg Gynecol Obstet.* 1991;172:362-366.
- [81] Harris ES, Morgan RF, Rodeheaver GT. Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents. *Surgery.* 1995;117:663-669.
- [82] Hellebrekers BW, Trimbos-Kemper TC, Boesten L, Jansen FW, Kolkman W, Trimbos JB, et al. Preoperative predictors of postsurgical adhesion formation and the Prevention of Adhesions with Plasminogen Activator (PAPA-study): results of a clinical pilot study. *Fertil Steril.* 2009;91:1204-1214.
- [83] Ince A, Eroglu A, Tarhan O, Bulbul M. Peritoneal fibrinolytic activity in peritonitis. *Am J Surg.* 2002;183:67-69.
- [84] Nordenhem A, Wiman B. Tissue plasminogen activator (tPA) antigen in plasma: correlation with different tPA/inhibitor complexes. *Scand J Clin Lab Invest.* 1998;58:475-483.
- [85] products Cfvm. Glycerol Formal: Summary Report. In: Agency EM, editor.: EMA; 1996.
- [86] Spiegel AaN, MM. Use of non-aqueous solvents in parenteral products. *J Pharm Sci.* 1963;52:917-927.
- [87] Ramchandani M, Robinson D. In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. *J Control Release.* 1998;54:167-175.
- [88] Goepferich A, Shieh L, Langer R. Aspects of polymer erosion. *Materials Research Society Symposium Proceedings*1995. p. 155-160.
- [89] Lambert WJ, Peck KD. Development of an in situ forming biodegradable polylactide-co-glycolide system for controlled release of proteins. *J Control Release.* 1995;33:189-195.
- [90] Leuneberger H. *Physikalische Pharmazie: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft;* 2002.

- 54 -

Ansprüche

1. Sprühsystem zur Erzeugung einer in-situ gebildeten Matrix, das
 - a) mindestens eine lipophile Komponente, die mindestens ein auf Glycolsäure und Milchsäure basierendes Polymer und mindestens ein biokompatibles Lösungsmittel mit einem XlogP3-Wert von kleiner 0,2 enthält, und
 - b) mindestens eine hydrophile Komponente aufweist,wobei die mindestens zwei Komponenten vor der Anwendung getrennt voneinander vorliegen und erst zum oder beim Sprühen gemischt werden, wobei die Komponenten beim Aufsprühen auf menschliches Gewebe einen Film bilden.
2. Sprühsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich einen Wirkstoff enthält, der in einer der beiden Komponenten oder in beiden Komponenten gelöst und/oder dispergiert vorliegt.
3. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die lipophile Komponente ein PLGA-Polymer und ein biokompatibles Lösungsmittel für das PLGA-Polymer enthält.
4. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das biokompatible Lösungsmittel einen XlogP3-Wert von 0,2 bis -1,0 hat.
5. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das biokompatible Lösungsmittel ausgewählt ist aus Tetraglycol, Dimethylisoborbid und/oder Glycerolfomal.
6. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel eine LD₅₀ von mindestens 1 mg/ml hat.
7. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ein Poly(D,L-lactide-co-glycolide)polymer ist, bei dem das Verhältnis von Lactid zu Glycolid zwischen 25:75 und 75:25 liegt; und/oder dass das Polymer ein PLGA mit einer intrinsischen Viskositätszahl von 0,16 bis 0,70 dl/g ist; und/oder dass das PLGA-Polymer eine Molmasse, gemessen über Gelpermeationschromatographie, von 10 bis 63 kDa aufweist.
8. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass PLGA und biokompatibles Lösungsmittel so ausgewählt werden, dass 5 bis 60 Teile PLGA pro 100 Teile Lösungsmittel gelöst werden.
9. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile Komponente Wasser ist, gegebenenfalls mit darin gelöstem oder dispergiertem Wirkstoff.

- 55 -

10. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der nach dem Aufsprühen gebildete Film eine Abbauphase am aufgetragenen Ort von 2 bis 6 Wochen hat.
11. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff mindestens eine Nucleinsäure enthält, wobei die Nucleinsäure bevorzugt RNA, DNA, mRNA, siRNA, miRNA, piRNA, shRNA, Antisense-Nucleinsäure, Aptamer, Ribozym, katalytische DNA und/oder eine Mischung der Vorhergehenden ist.
12. Sprühsystem nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass eine Nucleinsäure enthalten ist, die einen fibrinolytischen Faktor, bevorzugt tPA codiert.
13. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein Plasminogenaktivatorinhibitor hemmendes Mittel enthält.
14. Sprühsystem nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das den PAI hemmende Mittel eine siRNA ist.
15. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure komplexiert mit einem Trägermittel vorliegt; wobei das Trägermittel bevorzugt ein Trägermittel mit positiv geladenen Gruppen ist, besonders bevorzugt Polyethylenimin.
16. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der gebildete Film eine zweiphasige Freisetzungskinetik aufweist.
17. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Polyplexe mit einem N/P-Verhältnis von 1 bis 10 enthalten sind.
18. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass tPA codierende DNA und PAI-Inhibitor in einem Verhältnis von 5:1 bis 1:5 enthalten sind.
19. Sprühsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Verwendung zur Applikation auf Peritoneum, insbesondere zur Verwendung zur Verhütung von chirurgischen Adhäsionen und Vernarbungen.

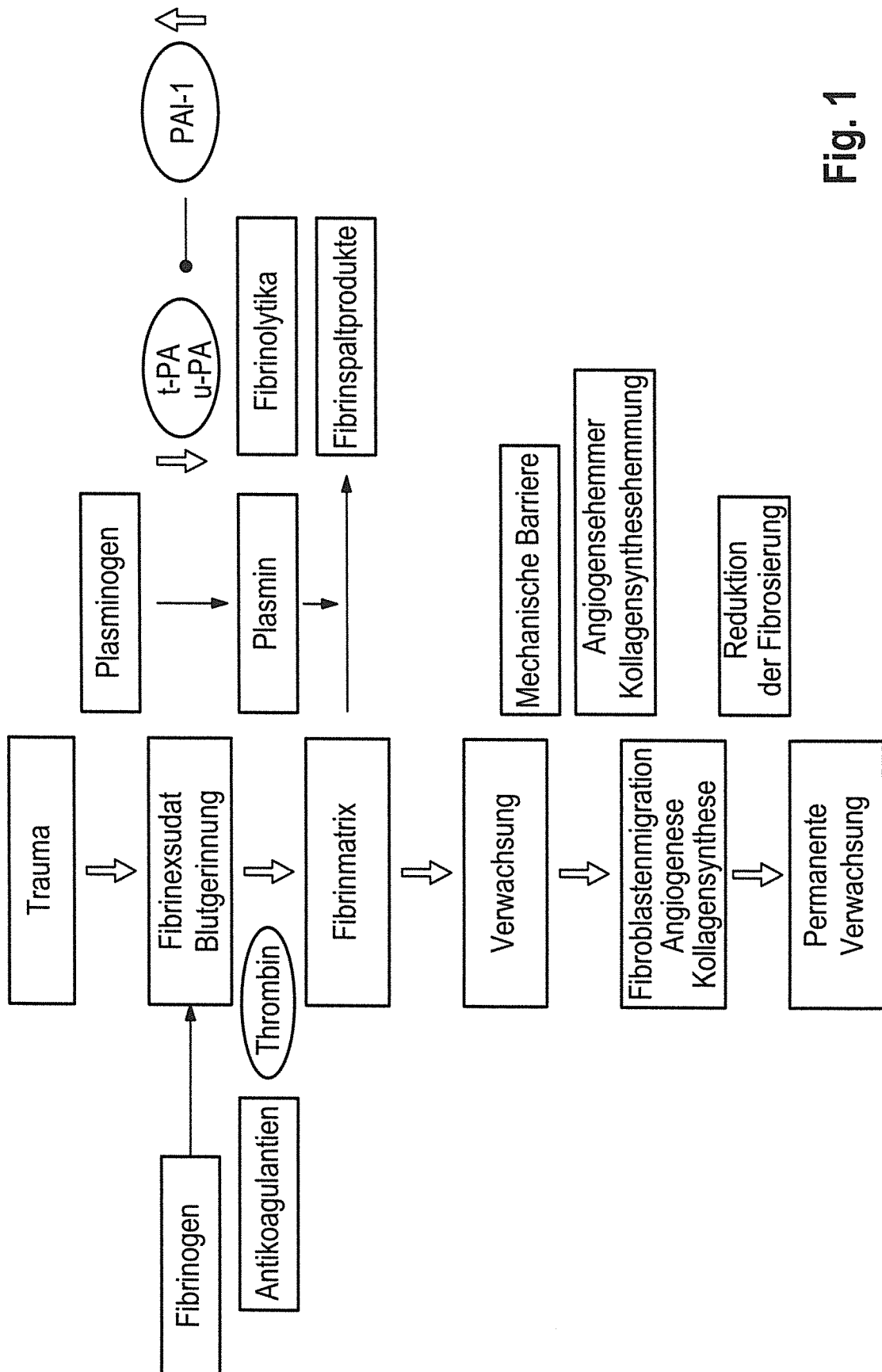
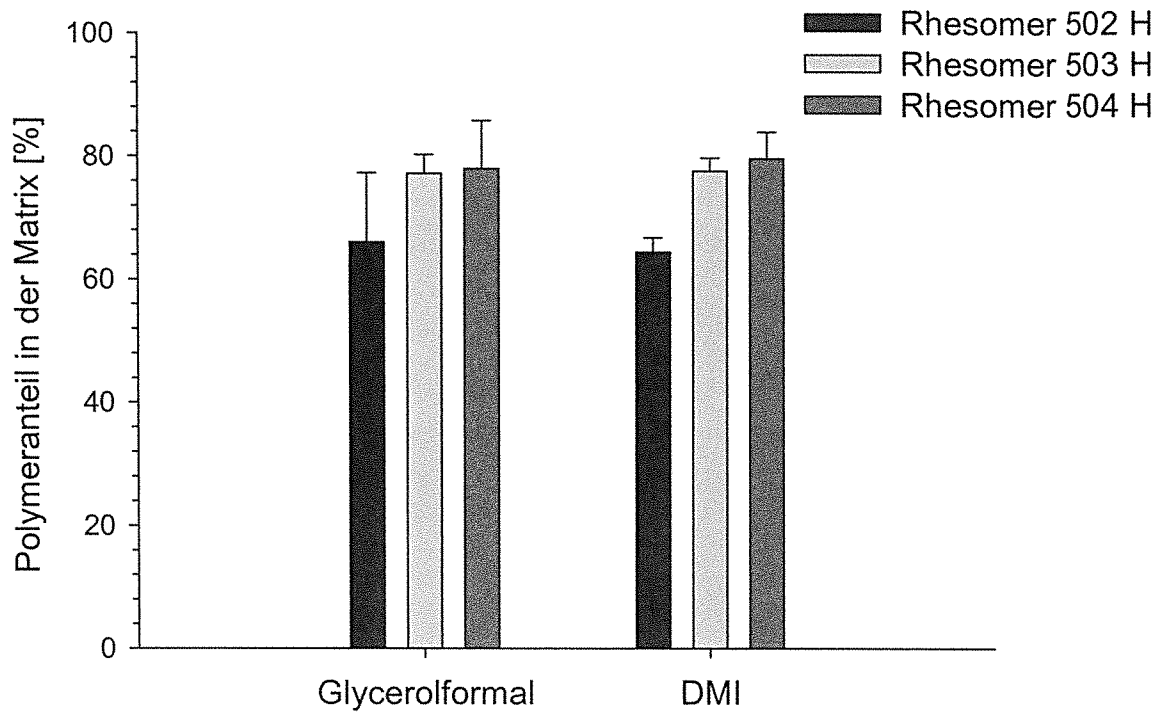


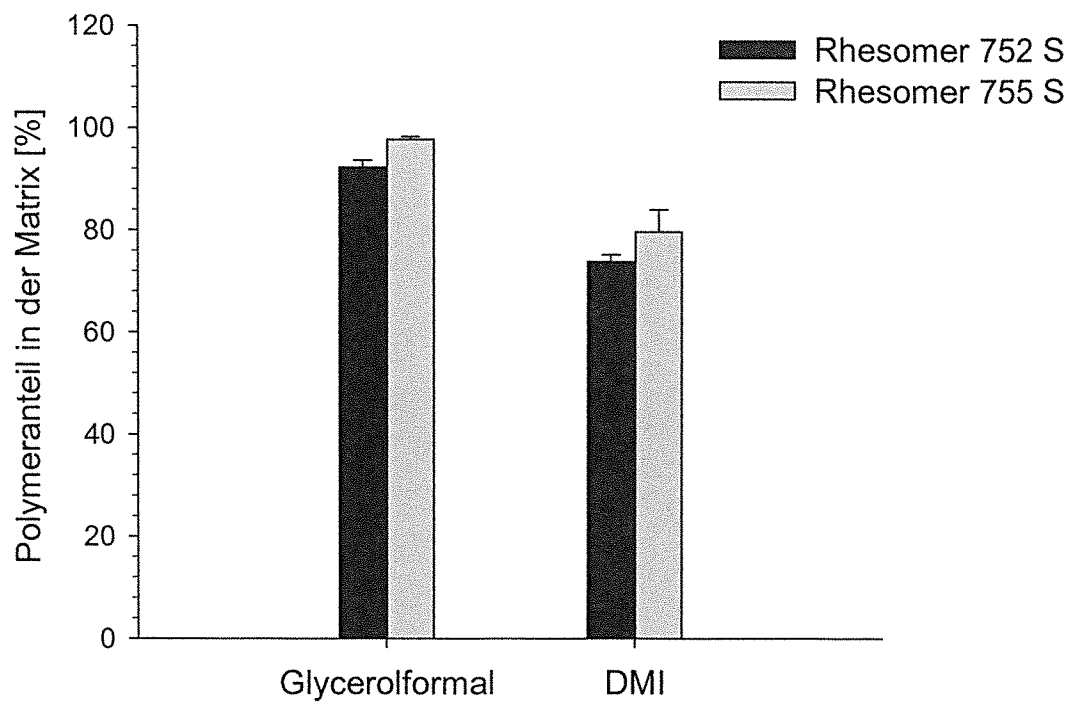
Fig. 1

Figur 2

A

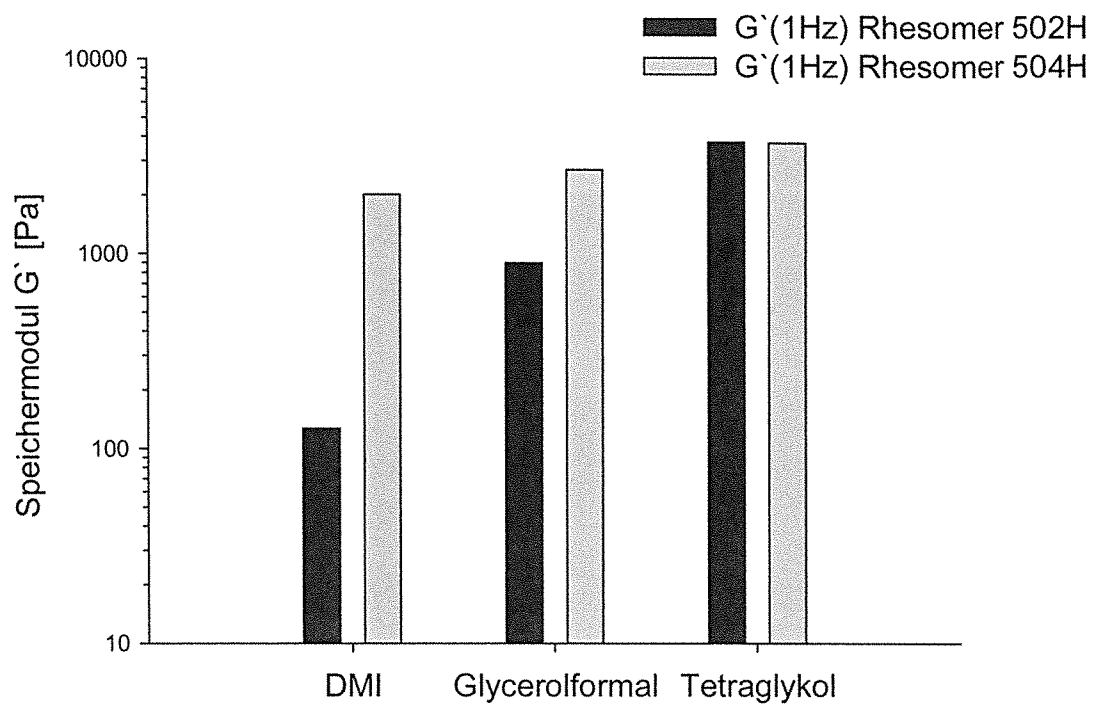


B

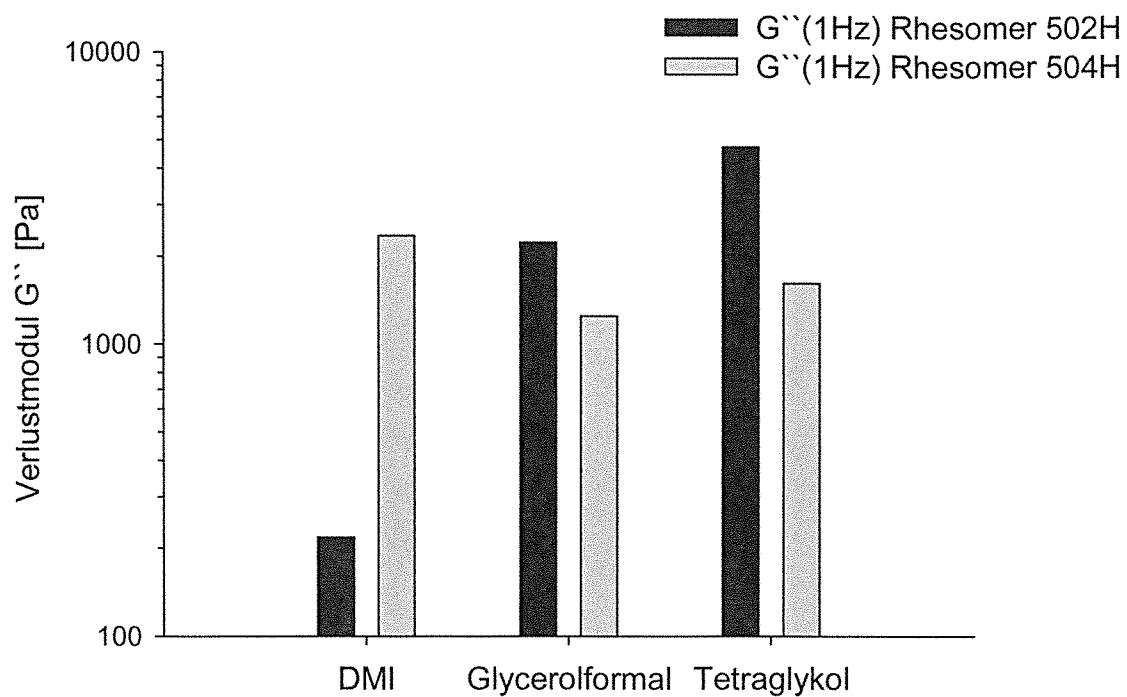


Figur 3

A

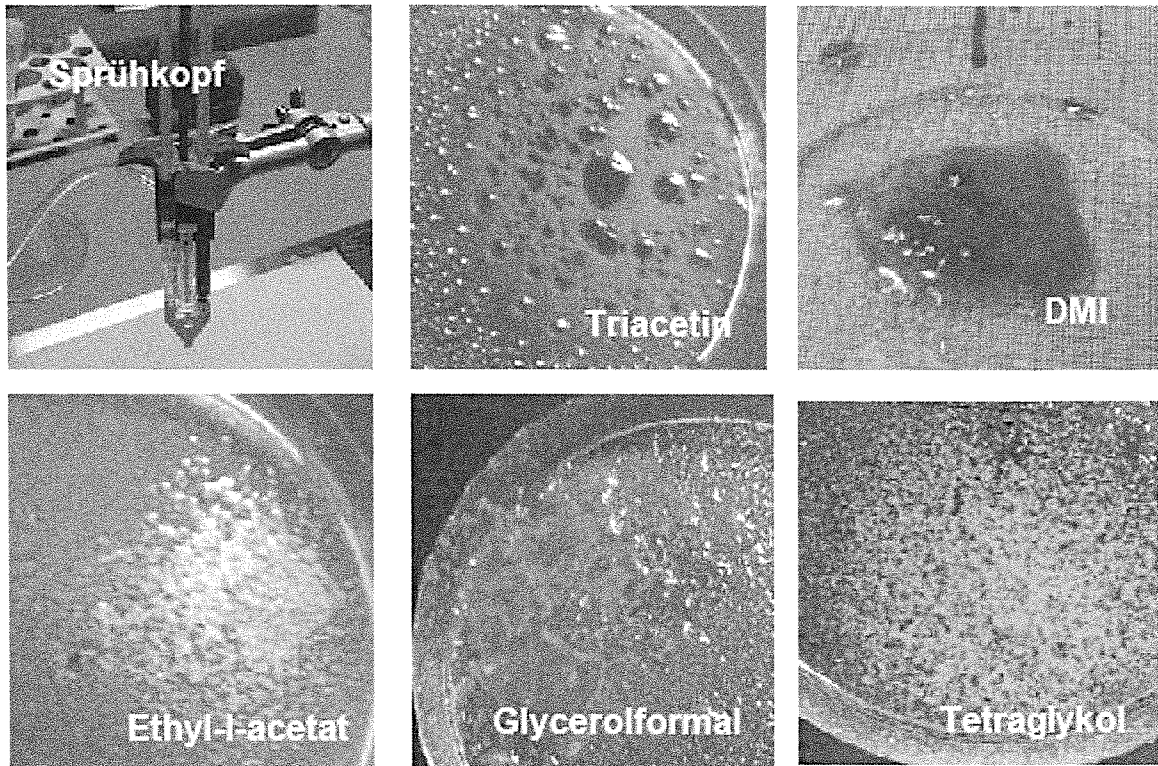


B

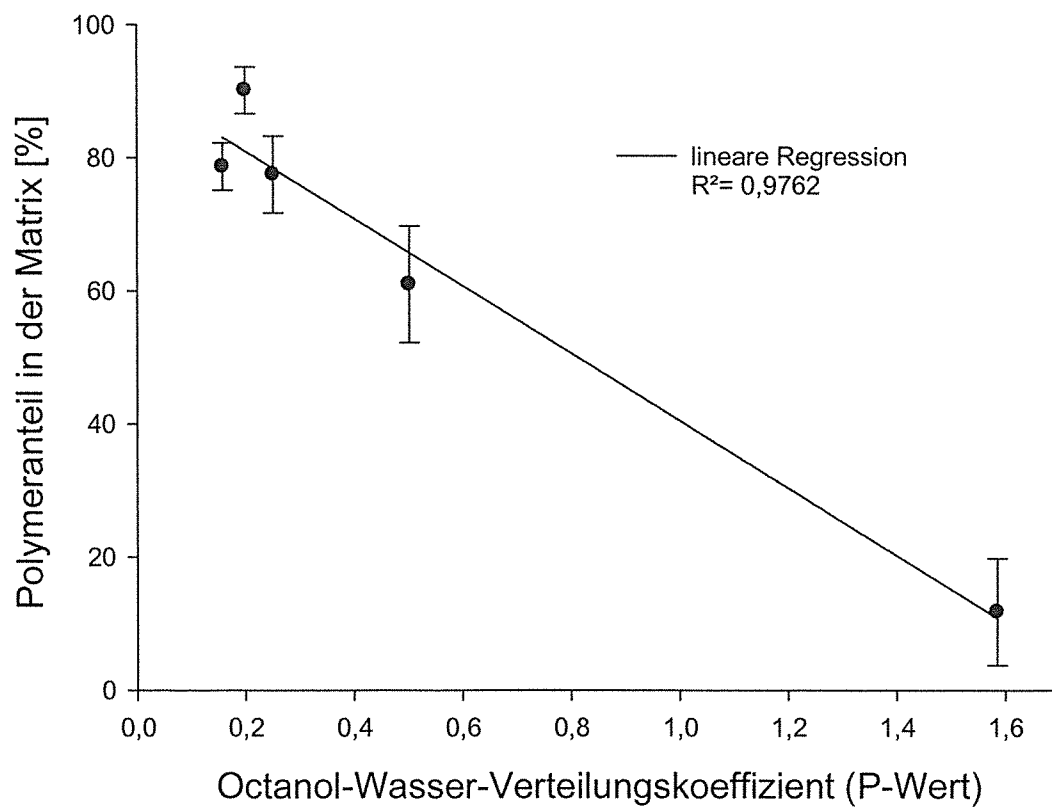


Figur 4

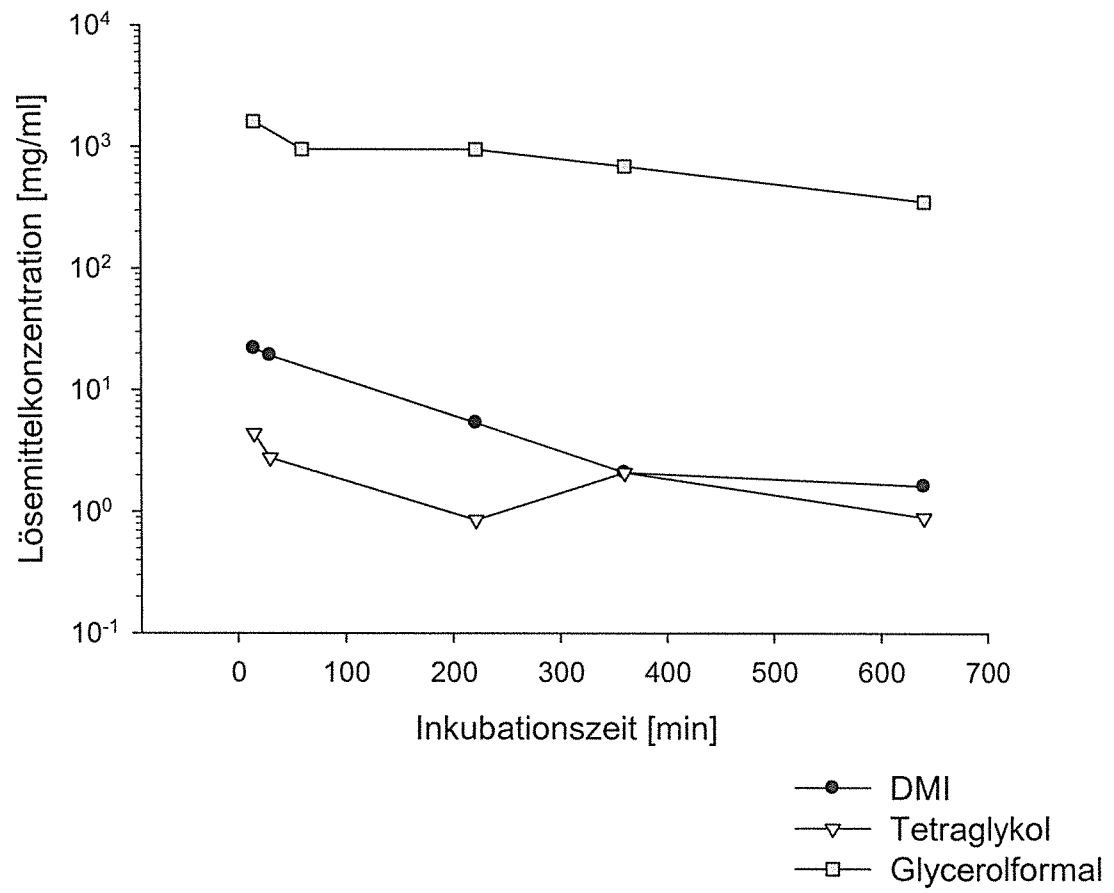
A



B



Figur 5



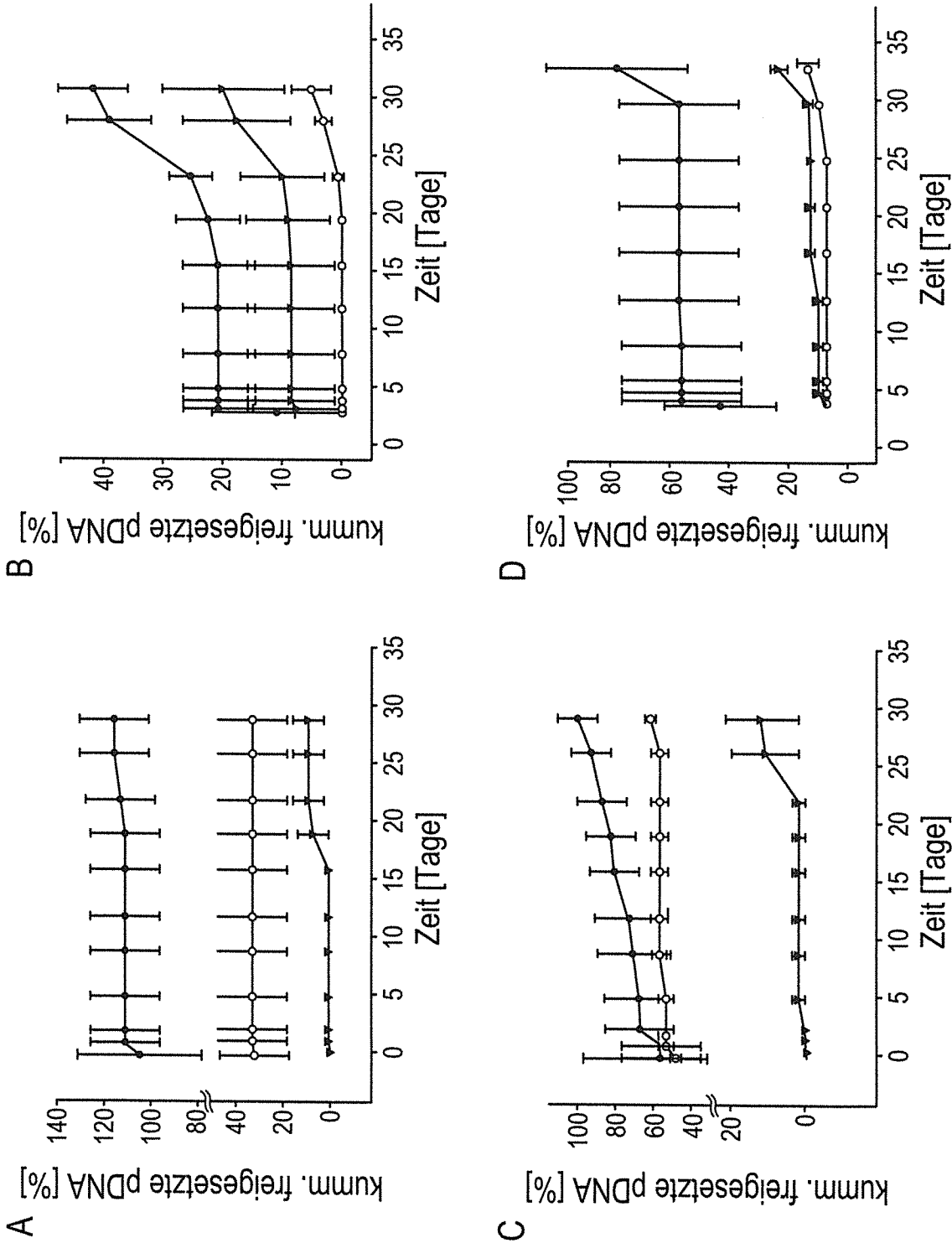


Fig. 6

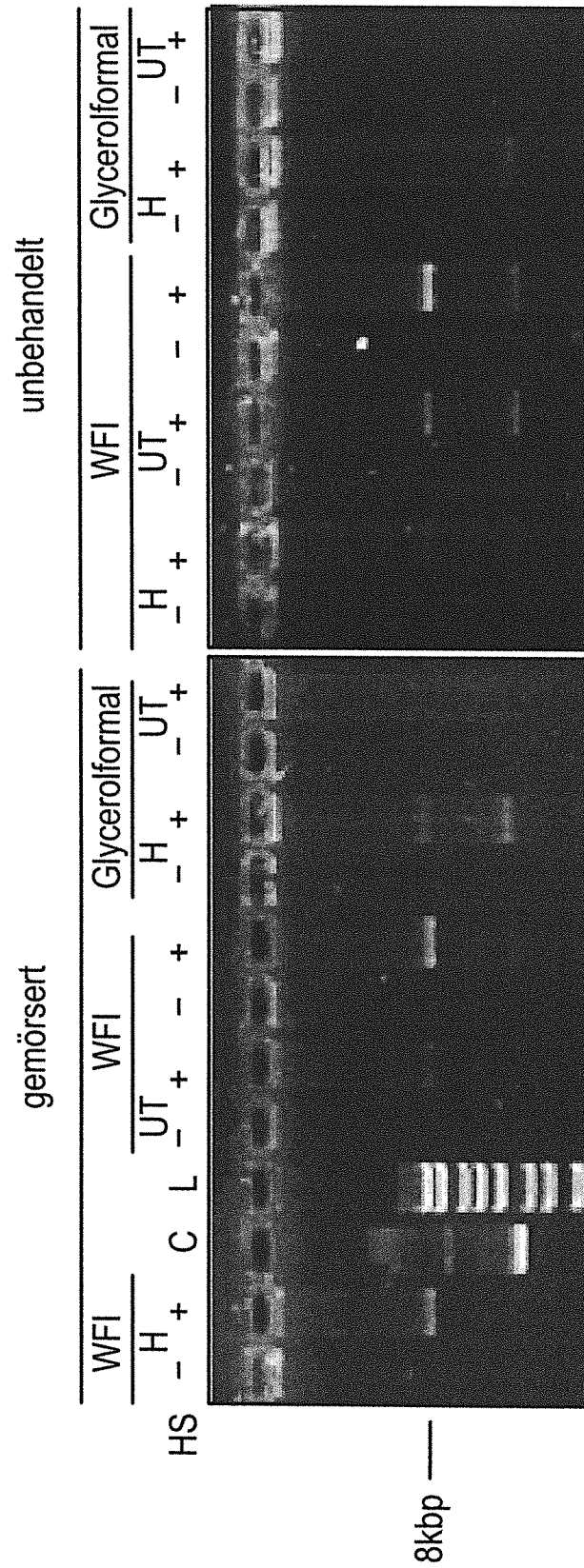
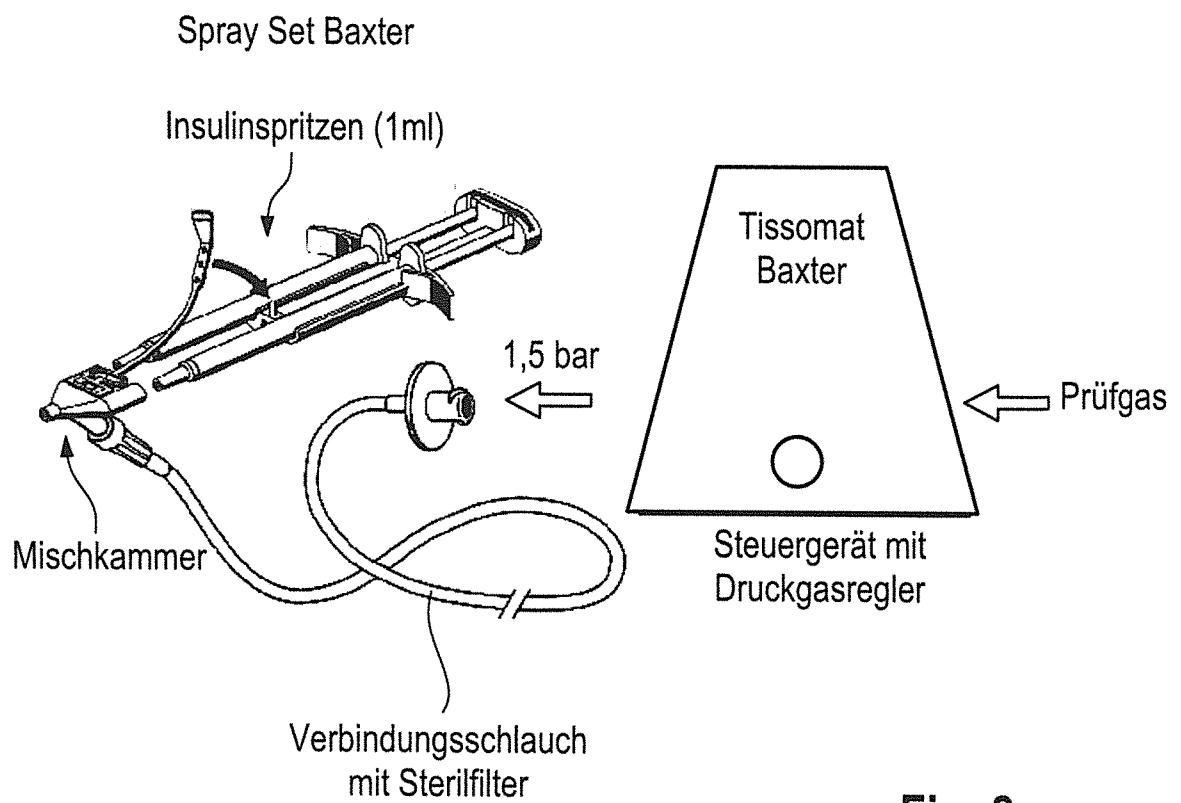
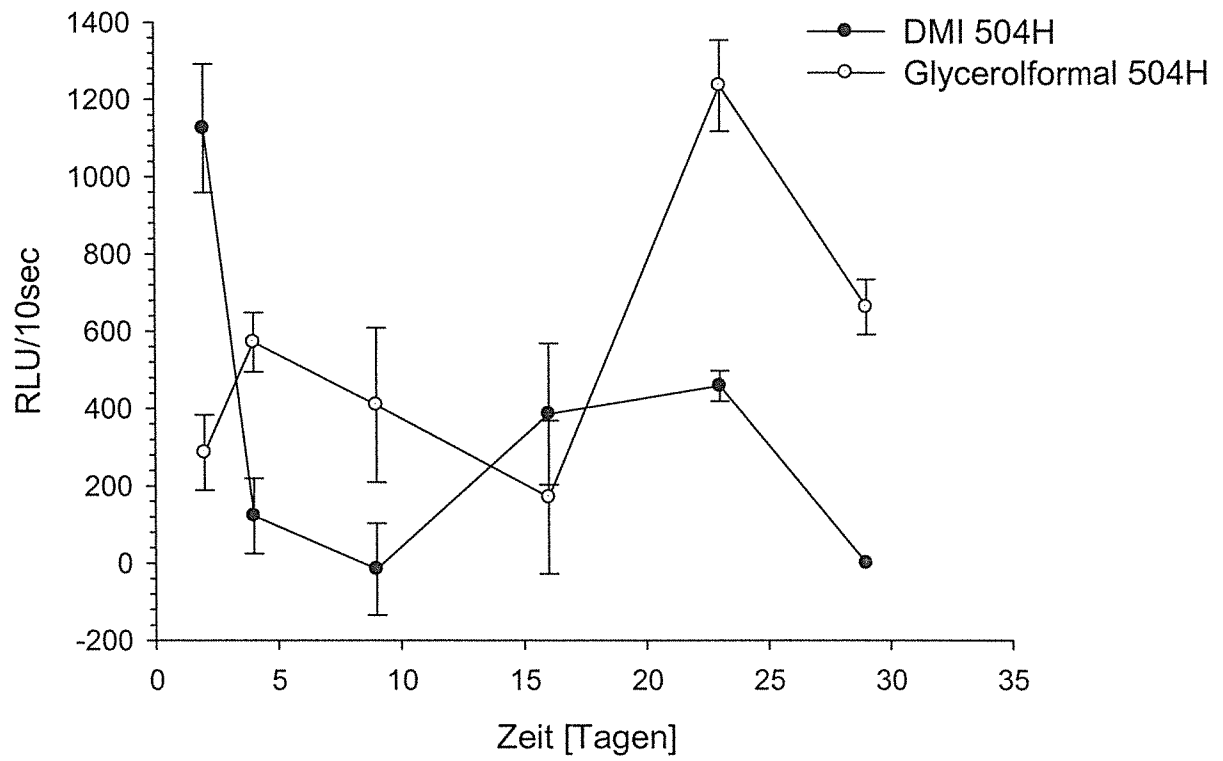


Fig. 7

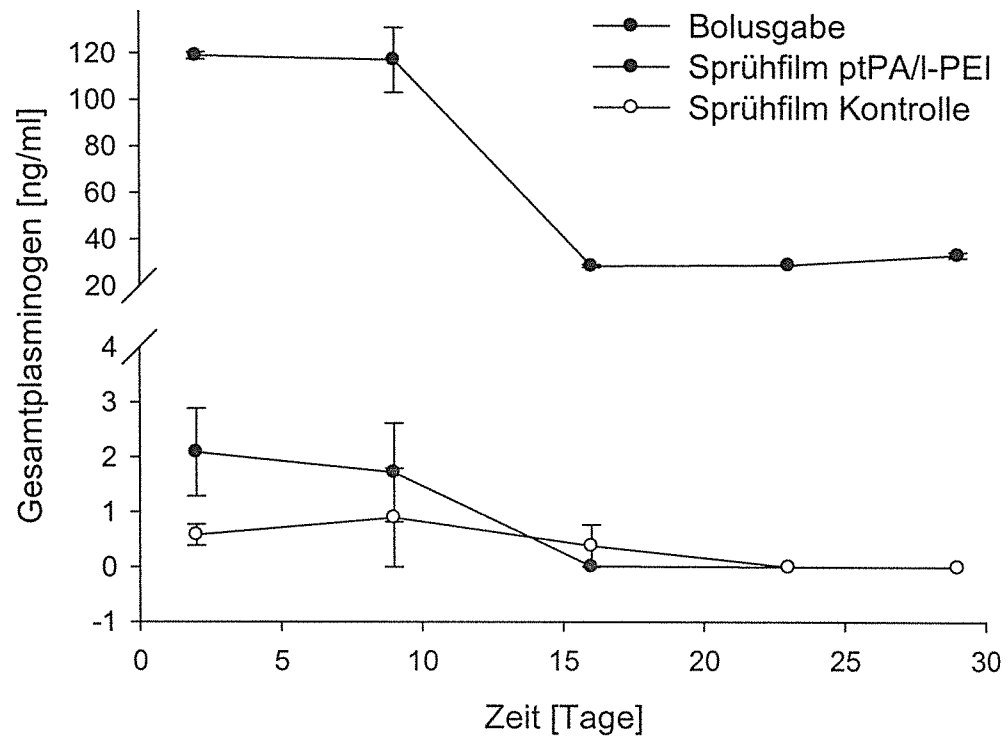
**Fig. 8**

Figur 9

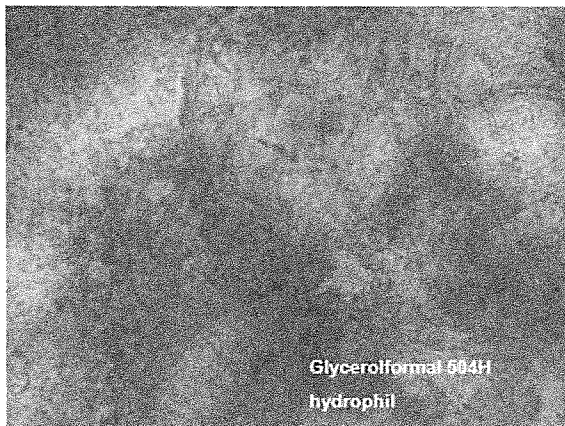


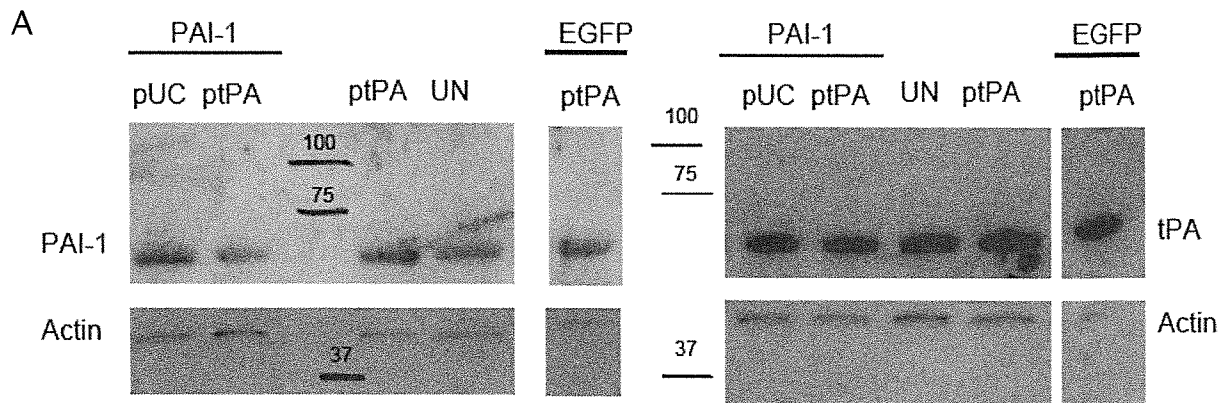
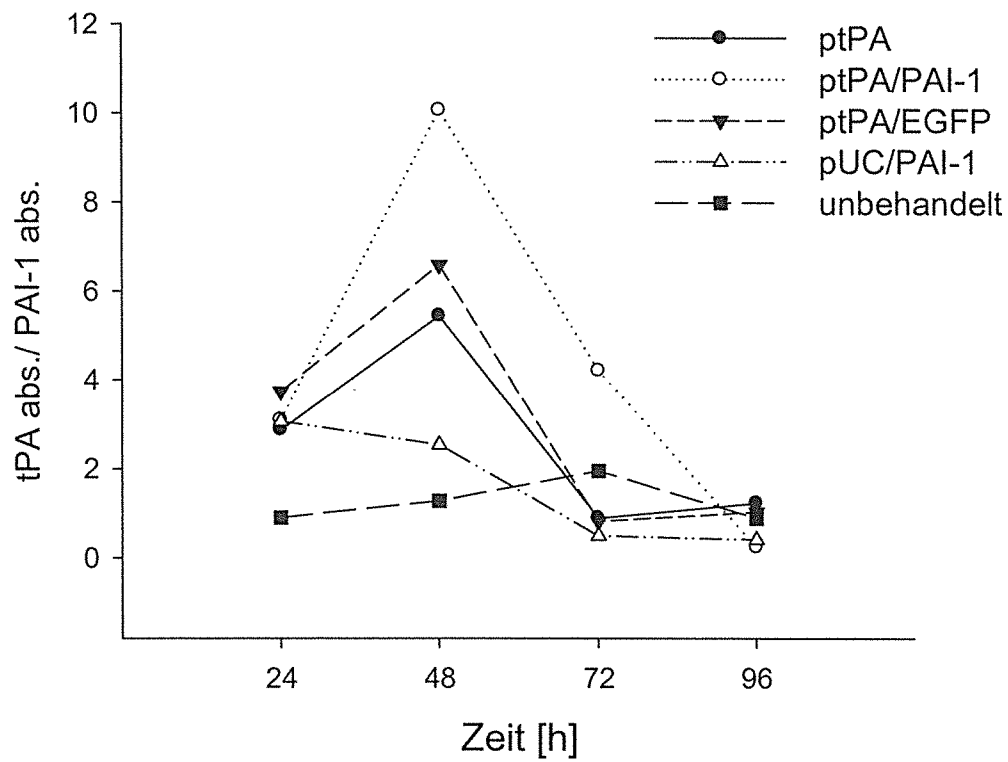
Figur 10

A

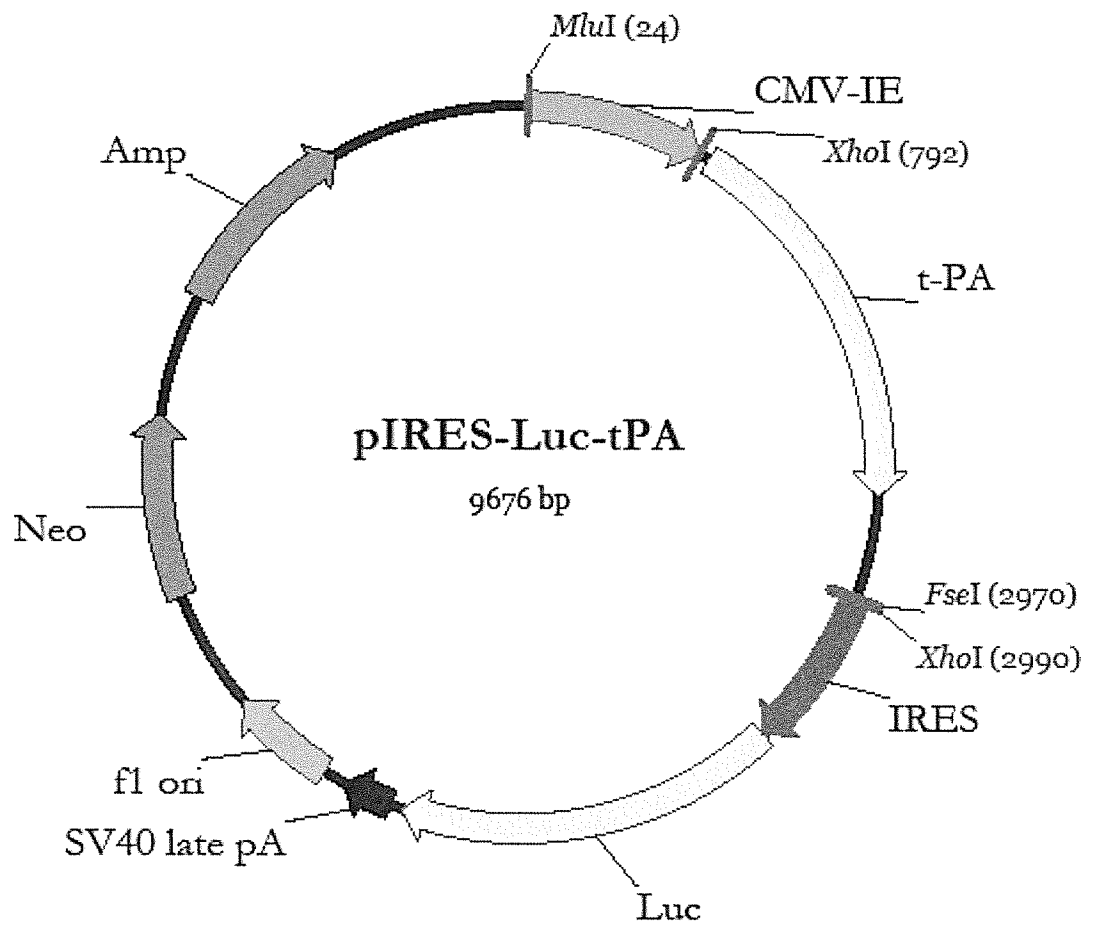


B

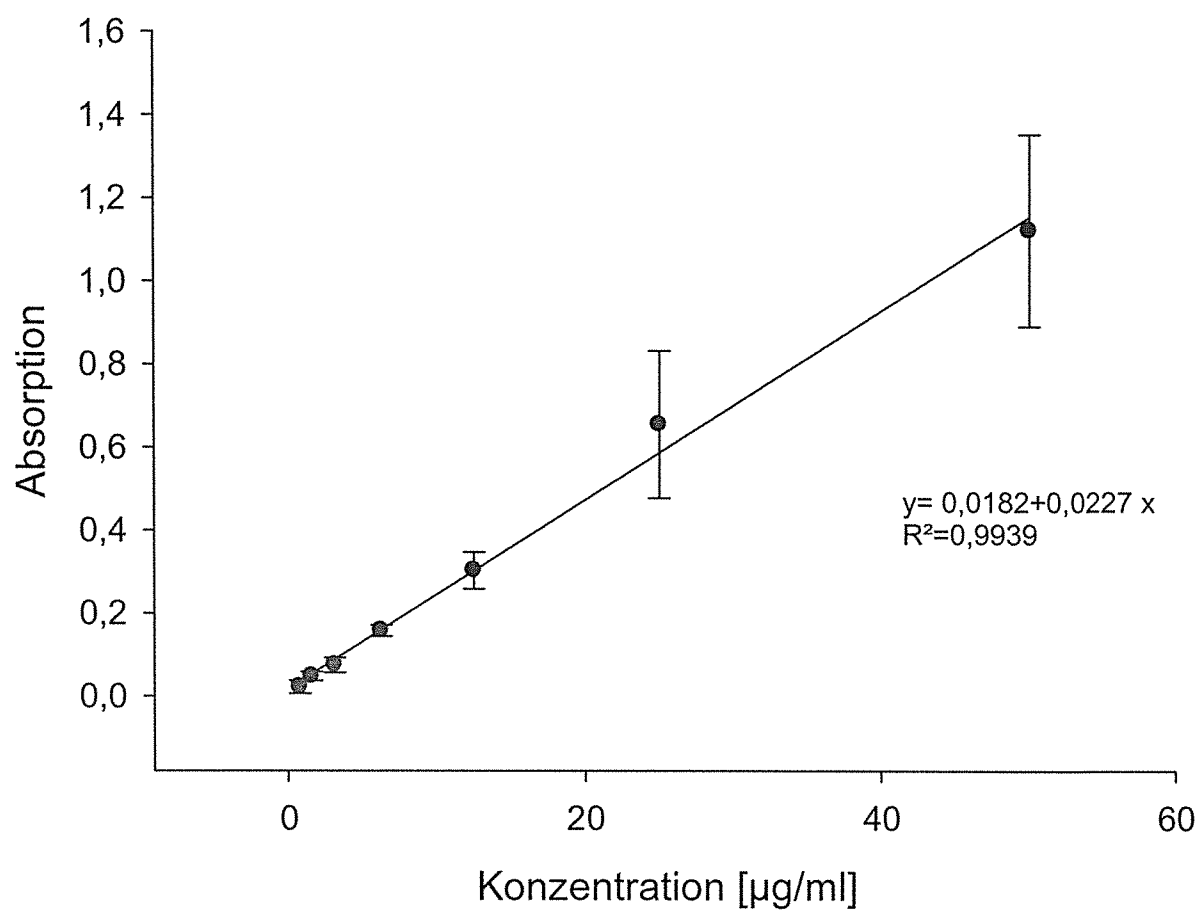


Figur 11**B**

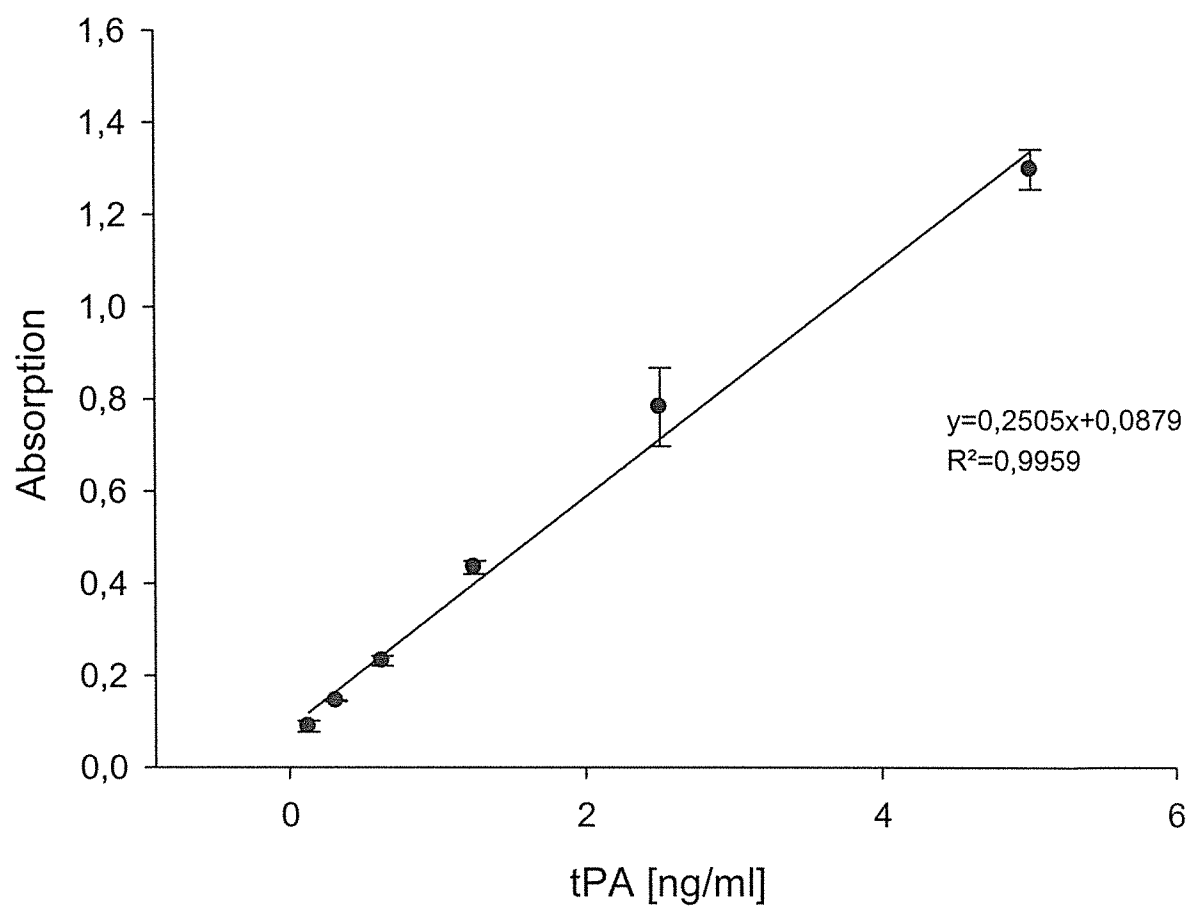
Figur 12



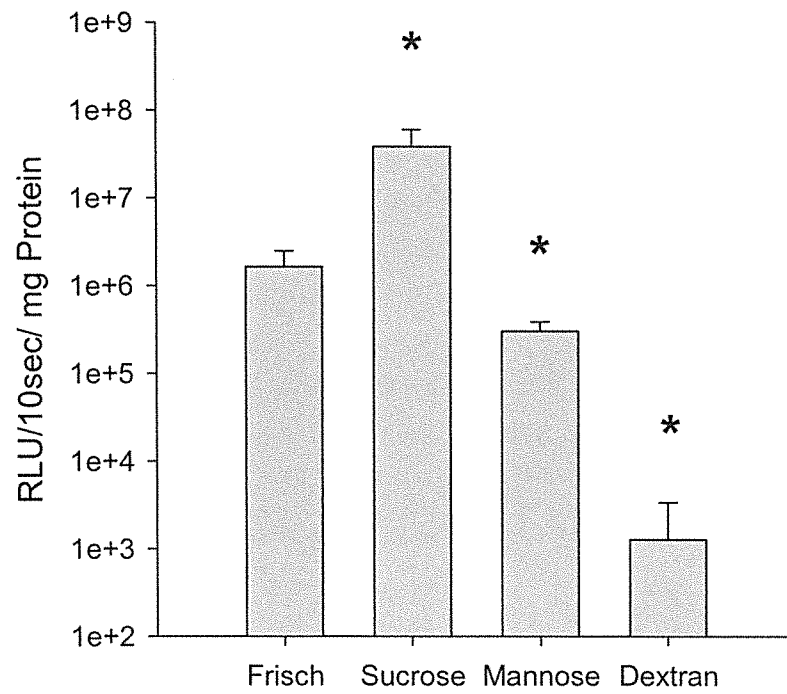
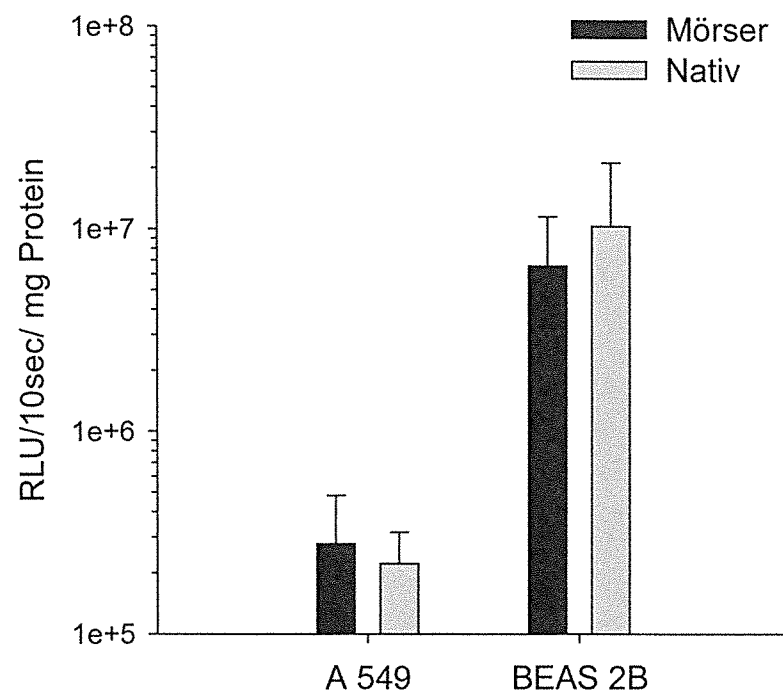
Figur 13



Figur 14



Figur 15

A**B**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/068889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K9/70 A61K47/48 A61K48/00 A61K47/34
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 521 455 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD [JP]; OSAKA AEROSOL IND CORP [JP]) 7 January 1993 (1993-01-07) claims 1-8 examples 6, 7 paragraph [0004] - paragraph [0022] -----	1-10,16, 17,19
X	US 6 103 266 A (TAPOLSKY GILLES H [US] ET AL) 15 August 2000 (2000-08-15) claims 1-37 column 4, line 4 - column 9, line 9 ----- -/--	1-10,16, 17,19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 December 2012

Date of mailing of the international search report

04/01/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schifferer, Hermann

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/068889

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAKADE S ET AL: "Transfection activity of layer-by-layer plasmid DNA/poly(ethylenimine) films deposited on PLGA microparticles", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 365, no. 1-2, 5 January 2009 (2009-01-05), pages 44-52, XP025760683, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2008.08.019 [retrieved on 2008-08-22] page 45, left-hand column, line 6 - page 51, left-hand column, line 12 -----	1-10,16, 17,19
X	WO 2010/142660 A2 (NOVARTIS AG [CH]; KELLER MICHAEL [CH]; GOGNIAT GEOFFREY [CH]) 16 December 2010 (2010-12-16) claims 1-17 -----	1-17,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/068889

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☒

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/068889

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0521455	A2	07-01-1993	CA 2072812 A1 03-01-1993
		EP 0521455 A2	07-01-1993
US 6103266	A	15-08-2000	NONE
WO 2010142660	A2	16-12-2010	NONE

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A61K9/70 A61K47/48 A61K48/00 A61K47/34 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) A61K		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 521 455 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD [JP]; OSAKA AEROSOL IND CORP [JP]) 7. Januar 1993 (1993-01-07) Ansprüche 1-8 Beispiele 6, 7 Absatz [0004] - Absatz [0022] -----	1-10, 16, 17, 19
X	US 6 103 266 A (TAPOLSKY GILLES H [US] ET AL) 15. August 2000 (2000-08-15) Ansprüche 1-37 Spalte 4, Zeile 4 - Spalte 9, Zeile 9 ----- -/--	1-10, 16, 17, 19
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
19. Dezember 2012		04/01/2013
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Schifferer, Hermann

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KAKADE S ET AL: "Transfection activity of layer-by-layer plasmid DNA/poly(ethylenimine) films deposited on PLGA microparticles", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, Bd. 365, Nr. 1-2, 5. Januar 2009 (2009-01-05), Seiten 44-52, XP025760683, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2008.08.019 [gefunden am 2008-08-22] Seite 45, linke Spalte, Zeile 6 - Seite 51, linke Spalte, Zeile 12 -----	1-10,16, 17,19
X	WO 2010/142660 A2 (NOVARTIS AG [CH]; KELLER MICHAEL [CH]; GOGNIAT GEOFFREY [CH]) 16. Dezember 2010 (2010-12-16) Ansprüche 1-17 -----	1-17,19

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- a. (Form)
- ☐ in Papierform
- ☒ in elektronischer Form
- b. (Zeitpunkt)
- ☐ in der eingereichten internationalen Anmeldung
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form
- ☒ bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde.
2. ☒ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/068889

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0521455	A2	07-01-1993	CA 2072812 A1 03-01-1993
		EP 0521455 A2	07-01-1993
US 6103266	A	15-08-2000	KEINE
WO 2010142660	A2	16-12-2010	KEINE