

(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
13. Dezember 2007 (13.12.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/141050 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
A61K 9/51 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/005258

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2007 (07.06.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
60/811,756 8. Juni 2006 (08.06.2006) US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGE-
SELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13353
Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FISCHER, Katrin,
Claudia [DE/DE]; Corinthstr. 42, 10245 Berlin (DE).
GENERAL, Sascha [DE/DE]; Dircksenstr. 45, 10119
Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, 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, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: FUNCTIONALIZED SOLID POLYMER NANOPARTICLES FOR DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPLICA-
TIONS

(54) Bezeichnung: FUNKTIONALISIERTE, FESTE POLYMERNANOPARTIKEL FÜR DIAGNOSTISCHE UND THERAPEU-
TISCHE ANWENDUNGEN

(57) Abstract: The present invention describes polymer nanoparticles having a cationic surface potential, into which both hydrophobic and hydrophilic pharmaceutically active substances can be enclosed. The hydrophilic and thus water-soluble substances are enclosed through ionic complexation with a charged polymer in the core of the particle by means of coprecipitation. It is possible to use as pharmaceutically active substances for encapsulation both therapeutic and diagnostic agents. The cationic particle surface makes stable electrostatic surface modification possible with partially oppositely charged compounds which may, to improve the passive and active targeting, comprise target-specific ligands.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt Polymernanopartikel mit kationischem Oberflächenpotential, in welche sowohl hydrophobe als auch hydrophile pharmazeutisch aktive Substanzen eingeschlossen werden können. Die hydrophilen und somit wasserlöslichen Substanzen werden durch ionische Komplexierung mit einem geladenen Polymer in den Kern des Partikels mittels Co-Präzipitation eingeschlossen. Zur Verkapselung sind als pharmazeutisch aktive Substanzen sowohl Therapeutika als auch Diagnostika verwendbar. Die kationische Partikeloberfläche ermöglicht eine stabile, elektrostatische Oberflächenmodifikation mit partiell entgegengesetzt geladenen Verbindungen, die zur Verbesserung des passiven und aktiven Targetings zielspezifische Liganden enthalten können.



WO 2007/141050 A2

Funktionalisierte, feste Polymernanopartikel für diagnostische und therapeutische Anwendungen

Beschreibung der Erfindung

5

Die vorliegende Erfindung beschreibt Polymernanopartikel mit kationischem Oberflächenpotential, in welche sowohl hydrophobe als auch hydrophile pharmazeutisch aktive Substanzen eingeschlossen werden können. Die hydrophilen und somit wasserlöslichen Substanzen werden durch ionische

10 Komplexierung mit einem geladenen Polymer in den Kern des Partikels mittels Co-Präzipitation eingeschlossen. Zur Verkapselung sind als pharmazeutisch aktive Substanzen sowohl Therapeutika als auch Diagnostika verwendbar. Die kationische Partikeloberfläche ermöglicht eine stabile, elektrostatische Oberflächenmodifikation mit partiell entgegengesetzt geladenen Verbindungen,

15 die zur Verbesserung des passiven und aktiven Targetings zielspezifische Liganden enthalten können.

Hintergrund der Erfindung

20 Die besonderen Eigenschaften nanopartikulärer Drug Delivery Systeme beruhen vor allem auf ihrer geringen Größe, wodurch eine Überwindung unterschiedlicher physiologischer Barrieren möglich ist [Fahmy T.M., Fong P.M. et al., Mater. Today, 2005; 8(8): 18-26]. Die damit verbundene veränderte Verteilung im Organismus kann z. B. für die Diagnose als auch zur Therapie

25 verschiedener Tumorerkrankungen vorteilhaft genutzt werden.

Nanopartikuläre Systeme, welche sowohl zur Erkennung als auch zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden können, werden als sogenannte *Theranostika* (= *Therapeutika* + *Diagnostika*) bezeichnet. Das damit verbundene therapeutische Monitoring wird zukünftig ein schnelleres Erkennen

30 von Therapieresistenzen ermöglichen und durch rechtzeitigen Einsatz alternativer Therapien den Heilungserfolg des Patienten deutlich verbessern [Emerich D.F., Thanos C.G., Curr. Nanosci., 2005; 1: 177-188].

-2-

Eine in der Tumortherapie sehr erfolgreich eingesetzte Substanzklasse ist die Gruppe der Zytostatika. Alle sich schnell teilenden Zellen des Körpers, so auch Tumorzellen, werden durch diese Substanzen geschädigt. Dies führt allerdings nicht nur zu einem Absterben der Tumorzellen, sondern häufig sind auch
5 andere vitale Organe und Gewebe wie das Knochenmark, Schleimhäute oder Herzgefäße davon betroffen. Die damit verbundene unerwünschte Toxizität ist häufig der Dosis limitierende Faktor der Therapie [Silacci D., Neri M., Modern Biopharmaceuticals: Design, development and optimization, Volume 3, Part V, Wiley-VCH, Weinheim, 2005; 1271-1299].

10 Es konnte gezeigt werden, dass durch das Verkapseln solcher Substanzen in nanopartikuläre Systeme gesunde Gewebe weniger stark geschädigt werden und eine lokal höhere Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe erzielt wird [Silacci D., Neri M., Modern Biopharmaceuticals: Design, development and optimization, Volume 3, Part V, Wiley-VCH, Weinheim, 2005; 1271-1299]. Die
15 erfolgreiche Einführung des Marktproduktes Doxil[®] belegt den klinischen Vorteil einer solchen Nanoformulierung.

In erster Linie wird der Enhanced Permeation and Retention-Effekt (kurz EPR-Effekt) dafür verantwortlich gemacht. Dieser EPR-Effekt wurde bereits 1986 von
20 Matsumura und Maeda als eine Strategie zur gezielten Arzneistoffkumulation in soliden Tumoren beschrieben [Matsumura Y., Maeda H., Cancer Res., 1986; 46: 6387-6392][Maeda H., Adv. Enzyme Regul., 2001; 41: 189-207]. Es handelt sich hierbei um einen passiven Anreicherungsmechanismus, welcher die strukturellen Besonderheiten von tumorösem oder auch entzündetem Gewebe
25 ausnutzt [Ulbrich K., Subr V., Adv. Drug Deliv. Rev., 2004; 56(7): 1023-1050]. Insbesondere Tumorgewebe ist aufgrund seines schnellen Wachstums und verschiedener Botenstoffe meist durch eine fenestrierte „löchrige“ Gewebsstruktur sowie eine fehlende lymphatische Drainage gekennzeichnet. Je nach Tumorart wird die Größe der Fenestrierungen zwischen 380 nm und
30 780 nm angegeben, weshalb dieser Bereich auch als *nanosize window* bezeichnet wird [Hobbs S.K., Monsky W.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998; 95: 4607- 4612][Brigger I., Dubernet C. et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 2002; 54(5): 631-651]. Im Gegensatz dazu besitzen normale Gewebe wie Herz,

-3-

Gehirn oder Lunge so genannte *tight junctions*, welche mit weniger als 10 nm (meist 2 nm bis 4 nm) Durchmesser undurchlässig für kolloidale Arzneistoffträger sind [Hughes G.A., Nanomedicine, 2005; 1(1): 22-30].

Im Blutstrom zirkulierende Nanopartikel sind somit in der Lage, sich passiv
5 durch Diffusion aus dem Blutstrom im Tumorgewebe anzureichern. Eine fehlende lymphatische Drainage begünstigt die dauerhafte Anreicherung im Tumor bzw. verhindert einen schnelles Auswaschen der Nanopartikel (EPR-Effekt).

10 Damit dieser Anreicherungsmechanismus möglich ist, müssen die Nanopartikel ausreichend lange im Blutstrom zirkulieren. Voraussetzung dafür sind Partikelgrößen zwischen ca. 10 nm und 380 nm sowie geeignete Partikeloberflächen. Beispielsweise können pegylierte Partikeloberflächen verhindern, dass körpereigene Proteine die Partikel als fremd identifizieren und
15 eine schnelle Eliminierung über die Organe des retikulo-endothelialen Systems (kurz RES) erfolgt [Otsuka H. et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 2003; 55(3): 403-419]. Durch die Nutzung aktiver Liganden auf der Partikeloberfläche (z.B. Antikörper) kann die gewebsspezifische Anreicherung nochmals optimiert werden [Nobs L. et al., Pharm. Sci., 2004; 93: 1980-1992] [Yokoyama M., J. Artif. Organs, 2005; 8: 77-84].
20

Für eine Aufnahme der Wirkstoffe in die Zelle muss eine weitere physiologische Barriere, die Zellmembran, überwunden werden. Die Schwierigkeit besteht für viele Arzneistoffe u. a. darin, dass die Zelle sehr effektive
25 Transportmechanismen (z. B. P-Glycoprotein) zum Ausschleusen fremder oder toxischer Substanzen besitzt. Wird jedoch der Wirkstoff mit Hilfe von Nanopartikeln in die Zelle über Endozytose eingeschleust, so können ausschleusende Transporter umgangen und die so genannte Multi Drug Resistance (MDR) verhindert werden [Bharadwaj V., J. Biomed. Nanotechnol., 2005; 1: 235-258] [Huwylar J. et al., J. Drug Target., 2002; 10(1): 73-79].
30

Die Internalisierung in die Zelle erfolgt bei Nanopartikeln meist mittels Endocytose. Aus diesem Grund liegen die Partikel nach dem Aufnahmeprozess

-4-

in Endosomen bzw. Endolysosomen vor [Koo O.M. et al., Nanomedicine, 2005; 1(3):193-212]. Sofern keine Freisetzung der Partikel aus den Endolysosomen stattfindet, kommt es innerhalb der Vesikel zu einem enzymatischen Abbau von Wirkstoff und kolloidalem Trägersystem. Eine endolysosomale Freisetzung der Partikel und damit des Wirkstoffes ist deshalb für den intrazellulären therapeutischen Effekt essentiell.

Die Freisetzungseigenschaften des Wirkstoffes aus dem Nanopartikel können zusätzlich durch gezielte Auswahl des Polymers gesteuert werden. Eine nanopartikuläre Formulierung kann somit die Applikationshäufigkeit minimieren sowie zu einer Reduktion der therapeutisch notwendigen Dosis führen. Weiterhin können unerwünschte Plasmaspiegelspitzen durch Verkapselung in Nanopartikel vermieden und eine verzögerte Freisetzung erzielt werden.

Zusammengefasst sind folgende Vorteile sind für die Entwicklung von Polymernanopartikeln ausschlaggebend: (i) gezielte Anreicherung der Wirkstoffe (a) passiv mittels EPR-Effekt, (b) aktiv mittels gewebs- oder zellspezifischer Liganden, z. B. Antikörper, (ii) steuerbare Wirkstoff-Freisetzung durch gezielte Polymerauswahl, (iii) Vermeidung starker Schwankungen der Plasmaspiegel, (iv) Senkung der Dosis bzw. Steigerung der Effektivität bei gleicher Dosis, (v) geringere Nebenwirkungen bei erhöhtem Sicherheitsprofil, (vi) verringerte Applikationshäufigkeit mit verbesserter Compliance und (vii) Umgehung von Resistenzmechanismen (P-Glycoprotein) [Rosen H., Aribat T., Nature Reviews Drug Discovery, 2005 May; 4(5): 381-5][McLennan D.N., Porter C.J.H. et al., Drug Discovery Today: Technologies, 2005 Spring; 2(1): 89-96]. Ein nanopartikuläres System, welches die Gesamtheit der beschriebenen Vorteile bereits erfüllt, ist nach dem aktuellen Wissensstand noch nicht entwickelt worden. Auch die Vielfalt der in der Literatur beschriebenen nanopartikulären Trägersysteme macht deutlich, dass es zum jetzigen Zeitpunkt nicht eine optimale Nanoformulierung für alle Problemstellungen gibt. Neben der Größe sind der gesamte Aufbau der Partikel, die matrixbildenden Substanzen und vor allem ihre Oberfläche für das Verhalten in vivo von entscheidender Bedeutung [Choi S.W., Kim W.S., Kim J.H., Journal of Dispersion Science and

-5-

Technology, 2003; 24(3&4): 475-487]. Hinzu kommt, dass die physikochemischen Eigenschaften verschiedener Wirkstoffe sich stark unterscheiden. Es besteht demzufolge nach wie vor ein Bedarf in der Entwicklung kolloidaler Arzneistoffträgersysteme mit verbesserten Eigenschaften.

5

Für zukünftige therapeutische Ansätze wird es beispielsweise notwendig sein, durch einen diagnostischen Nachweis der Verteilung der Partikel im Organismus zu belegen, dass eine Anreicherung vor allem im erkrankten Gewebe (z. B. im Tumor) stattfindet.

10 Für eine Detektion in vivo stehen unter anderem optische Bildgebungsverfahren wie die Sonographie, die Röntgendiagnostik, Schnittbildverfahren (CT, MRT) und die Nuklearmedizin (PET, SPECT) zur Verfügung. Eine weitere und relativ neue Methode ist Optical Imaging, dessen Detektionsprinzip auf der Nutzung von Nahinfrarot-Fluoreszenz beruht. Es handelt sich um ein nicht-invasives
15 Verfahren, welches ohne ionisierende Strahlung arbeitet und im Vergleich zu Verfahren wie dem MRT sehr kostengünstig und wenig aufwendig ist. Die für eine solche Anwendung entwickelten NIR-Farbstoffe wie Indocyaningrün sind sehr gut wasserlöslich, weshalb es schwierig ist, diese effizient in eine hydrophobe Polymermatrix zu verkapseln. Grund ist der schnelle Wechsel der
20 hydrophilen Substanz in die wässrige Phase beispielsweise bei der Herstellung mittels Nanopräzipitation.

Für die Verkapselung hydrophiler Substanzen in Nanopartikel stehen nur wenige Technologien zur Verfügung, die unterschiedliche Nachteile aufweisen. Der amphiphile Charakter von Liposomen oder Polymerosomen ermöglicht
25 beispielsweise den Einschluss hydrophiler Substanzen in den wässrigen Innenraum der Partikel, wohingegen hydrophobe Verbindungen in der Membran eingelagert werden können. Aufgrund der Lokalisierung im Kern oder in der Hülle der Partikel ist die Beladung sehr limitiert und damit meist unzureichend. Nachteilig ist weiterhin, dass vor allem hydrophile Substanzen in wässriger
30 Umgebung schnell aus solchen Systemen ausgewaschen werden.

Eine alternative Verkapselung wasserlöslicher Substanzen in Polyelektrolytkomplexe ist nur begrenzt möglich, da Farbstoffe wie beispielsweise Indocyaningrün (ICG) kleine Moleküle mit nur wenigen

-6-

geladenen Gruppen sind, womit nur unzureichend Ladungen für eine elektrostatische Komplexierung zur Verfügung stehen. Hinzu kommt, dass Polyelektrolytkomplexe in wässriger Lösung sehr dynamische Systeme sind, wodurch diese meist eine unzureichende kolloidale Stabilität in Plasma aufweisen [Thünemann A.F. et al., Adv. Polym. Sci., 2004; 166: 113-171].

Wie zuvor beschrieben wird es zukünftig erforderlich sein, mittels einem diagnostischen Nanopartikel zu belegen, dass die Anreicherung der Partikel vor allem am Zielort, beispielsweise dem Tumor, stattfindet. Wird dieser Nachweis erbracht, so kann eine therapeutisch aktive Substanz in ein-und dasselbe System verkapselt werden und einen maximalen therapeutischen Effekt am Wirkort erzielen, da ja die erwünschte Verteilung der Nanopartikel bereits mittels des diagnostischen Systems nachgewiesen wurde. Um die Verteilungseigenschaften der Partikel nicht zu verändern ist es deshalb wichtig, für den diagnostischen Nachweis und die anschließende Behandlung ein und dasselbe nanopartikuläre System nutzen zu können. Wie zuvor beschrieben, gibt es eine Reihe unterschiedlicher nanopartikulärer Systeme, welche allerdings entweder für die Verkapselung hydrophiler oder hydrophober Substanzen geeignet sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass nur geringe Veränderungen der Nanopartikeleigenschaften wie Partikelgröße, Oberflächenmaterial, Art des Matrixpolymers oder auch die Verwendung eines anderen Tensids einen enormen Einfluss auf die Verteilung der Partikel im Organismus haben. Deshalb ist es wichtig, sowohl Diagnose, Therapie als auch ein mögliches Monitoring der Behandlung mit ein-und demselben System durchführen zu können.

Idealerweise sollten deshalb in ein- und demselben nanopartikulären System sowohl wasserlösliche Farbstoffe zur Diagnose als auch therapeutische Substanzen, welche meist aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften schwer wasserlöslich sind, effektiv und mit einer ausreichenden Stabilität gegen Auswaschen verkapselt werden können.

Eine technologische Herausforderung besteht weiterhin darin, durch die Verwendung geeigneter Oberflächen einerseits eine ausreichende

-7-

Partikelstabilität und andererseits eine spezifische Anreicherung im Zielgewebe zu gewährleisten. Der Verbleib am Ort der Anreicherung (Zielgewebe) wiederum ist u. a. davon abhängig, wie gut die Partikel in das Gewebe und die Zelle aufgenommen werden.

5

Aus der Literatur ist bekannt, dass kationische Partikeloberflächen eine Aufnahme in die Zelle begünstigen [Mounkes L.C. et al., J. Biol. Chem., 1998; 273(40): 26164-26170] [Mislick K.A., Baldeschwieler J.D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996; 93: 12349–12354]. Grund sind elektrostatische Wechselwirkungen
10 zwischen der negativ geladenen Zellmembran (sulfatierte Proteoglykane) und der kationischen Partikeloberfläche (meist protonierte Aminfunktionen). Hinzu kommt, dass Aminogruppen tragende Polymere oder Substanzen dafür bekannt sind, endosmotische Aktivität zu besitzen, d.h. sie fördern eine intrazelluläre Freisetzung der Partikel aus den Endolysosomen durch Schädigung der
15 Endolysosomenmembran [DeDuve C. et al., Biochem. Pharmacol., 1974; 23:2495-2531]. Verbleiben die Partikel innerhalb der Zelle in den Endolysosomen, findet ein Abbau der Partikelmatrix sowie der darin eingeschlossenen Substanzen über zelleigene Enzyme statt. Die endolysosomale Freisetzung der verkapselten Wirkstoffe ist deshalb essentiell
20 für den therapeutischen Effekt.

Problematisch ist jedoch, dass teilweise schwerwiegende toxikologische Effekte bei in vivo Untersuchungen von Polyplexen und Lipiden mit stark kationischen geladenen Oberflächen beschrieben worden sind [Kircheis S. et al., J. Gene
25 Med., 1999; 1: 111–120][Ogris M. et al., Gene Ther., 1999;6: 595–605]. Die Ursache liegt darin, dass kationische Partikel mit negativ geladenen Erythrozyten aggregieren und es dadurch zu einer Blockade der Blutgefäße kommt. Zusätzlich führt dies meist zu einer starken Akkumulation in der Lunge, welche die Partikel als erstes Kapillarbett nach i.v. Applikation passieren
30 [Kircheis R. et al., Drug Deliv. Rev., 2001; 53(3): 341-58]. Hier besteht die Gefahr einer Lungenembolie, begünstigt durch Agglomerate aus Partikeln und Erythrozyten oder anderen Blutkomponenten [Kircheis S. et al., J. Gene Med., 1999; 1: 111–120][Ogris M. et al., Gene Ther., 1999;6: 595–605].

-8-

Idealerweise sollten deshalb nanopartikuläre Systeme mit kationischen Oberflächeneigenschaften hergestellt werden, ohne dass mögliche toxikologisch bedenkliche Eigenschaften eine in-vivo Anwendung behindern. Zusätzlich muss die Partikeloberfläche gegenüber körpereigenen Abwehrmechanismen (Opsonine, RES) unauffällig sein, wodurch erst eine ausreichend lange Zirkulationszeit ermöglicht wird, welche Voraussetzung für eine entsprechende Anreicherung der Partikel aus dem Blutstrom im Zielgewebe ist. Dabei sollten die nanopartikulären Systeme weiterhin die Aufnahme in die Zielzelle und die endolysosomale Freisetzung unterstützen.

10

Eine weitere Schwierigkeit bei der Herstellung nanopartikulärer Systeme besteht darin, geeignete Substanzen oder Zielstrukturen auf der Partikeloberfläche aufzubringen.

Häufig wird die Oberfläche der Partikel mit Hilfe von kovalenten Kopplungsreaktionen modifiziert. Voraussetzung dafür sind funktionelle Gruppen am Polymerrückgrat bzw. an der Partikeloberfläche, welche durch entsprechende chemische Kopplungsreaktionen mit dem Zielmolekül irreversibel verknüpft werden können [Nobs L. et al., J. Pharm. Sci., 2004; 93: 1980-1992]. Da die Stabilität kolloidaler Dispersionen durch die Reagenzien bzw. unter den Reaktionsbedingungen häufig stark verringert wird, ist die chemische Durchführung meist aufwendig und problematisch [Koo O.M. et al., Nanomedicine, 2005; 1(3):193-212][Choi S.W. et al., J. Dispersion Sci. Technol., 2003; 24(3&4): 475-487]. Die kovalente Verknüpfung von Molekülen und Partikeloberflächen muss zusätzlich für jedes neue, auf die Oberfläche aufzubringende, Molekül speziell geeignet sein, um mögliche nicht gewollte chemische Reaktionen zu vermeiden. Auch eine Vermeidung von organischen Lösemitteln, häufig genutzt für kovalente Verknüpfungen, ist wegen der verringerten Belastung der Umwelt und der Vereinfachung der Durchführung der Reaktion anzustreben.

Idealerweise sollte deshalb eine nicht-kovalente, einfach durchzuführende und somit flexible und dennoch stabile Oberflächenmodifikation möglich sein.

-9-

Die aus der Literatur bekannten kolloidalen Systeme eignen sich meist nur zur Verkapselung hydrophober Substanzen oder aber hydrophiler Substanzen. Im Falle der häufig angewendeten kovalenten Oberflächenmodifikation der Partikel besteht wenig Flexibilität bezüglich der Nutzung unterschiedlichster
5 Oberflächenstrukturen auf ein-und demselben Kernpartikel. Hinzu kommt, dass sich die Liganden zur spezifischen Anreicherung oft nachteilig auf die Aufnahme im eigentlichen Tumorgewebe und insbesondere auf die Zellaufnahme auswirken. Sofern die Partikel eine ausreichende Zirkulation gewährleisten und sich passiv oder aktiv gut im Zielgewebe anreichern, so ist meist die
10 Internalisierung und die endolysosomale Freisetzung nicht optimal [van Osdol W., Cancer Res., 1991; 51: 4776–4784] [Weinstein J.N. et al., Cancer Res., 1992; 52(9): 2747-2751].

Folglich besteht auch weiterhin ein Bedarf an pharmazeutischen, nanopartikulären Formulierungen, welche: (i) sowohl wasserlösliche als auch
15 schwer wasserlösliche pharmazeutisch aktive Substanzen, effektiv und mit einer ausreichenden Stabilität gegen Auswaschen verkapseln (ii) eine nicht-kovalente, einfach durchzuführende (flexible) und dennoch stabile Oberflächenmodifikation ermöglichen, (iii) eine ausreichende Zirkulationszeit ermöglichen (iv), effektiv in das Zielgewebe aufgenommen werden sowie (v)
20 dort intrazellulär aus den Endolysosomen freigesetzt werden.

Eine Aufgabe der Erfindung war es deshalb, eine verbesserte pharmazeutische Formulierung zur Verfügung zu stellen, in welche zum einen hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe verkapselt werden können. Andererseits sollte eine
25 flexible und ausreichend stabile Oberflächenmodifikation eine optimale Anreicherung im erkrankten Gewebe ermöglichen. Um einen maximalen diagnostischen oder therapeutischen Effekt erzielen zu können, muss ein solches kolloidales System auch effizient in das Zielgewebe sowie in die einzelnen Zellen aufgenommen werden, wo eine endolysosomale Freisetzung
30 erfolgen kann. Ebenso sollte es sich um praktikable Herstellungsmethoden handeln, um die Herstellung in einem zeit- und kostengerechten Rahmen zu ermöglichen.

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung betrifft Polymernanopartikel mit einem kationischen Oberflächenpotential, enthaltend ein kationisches Polymer und ein in Wasser schwer lösliches Polymer, dadurch gekennzeichnet, dass diese Polymernanopartikel diagnostische und/oder therapeutische Agenzien enthalten.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass durch Co-Präzipitation eines wasserlöslichen kationischen Polymers mit einem schwer wasserlöslichen Polymer stabile Polymernanopartikel hergestellt werden können, welche eine kationisch funktionalisierte Oberfläche aufweisen. Weiterhin war im Sinne der Erfindung überraschend, dass sowohl hydrophile, gut wasserlösliche als auch hydrophobe, schwer wasserlösliche Substanzen in die Polymermatrix der zuvor beschriebenen Nanopartikel verkapselt werden konnten. Unerwarteterweise führte die ionische Komplexierung von wasserlöslichen Substanzen geringen Molekulargewichtes mit dem geladenen kationischen Polymer zu einer erfolgreichen Verkapselung in die Polymermatrix der Partikel mittels Nanopräzipitation. Im Sinne der Erfindung können Substanzen in die Polymerpartikel verkapselt werden, welche sich zur Diagnose und/ oder zur Therapie von verschiedenen Erkrankungen eignen. Weiterhin wurde gefunden, dass die kationisch funktionalisierte Partikeloberfläche elektrostatisch mit einer partiell entgegengesetzt geladenen Verbindung stabil und flexibel oberflächenmodifiziert werden kann. Die beschriebene Erfindung eignet sich damit zum Erkennen von Krankheiten (Diagnose), zur Behandlung von Krankheiten (Therapie) wie auch zum Monitoring einer Therapie. Weiterhin beinhaltet die Erfindung eine geeignete Arzneiform unter Verwendung von pharmazeutisch akzeptablen Hilfsstoffen, die für die jeweilige Arzneiform notwendig sind. Die im Sinne der Erfindung entwickelte Arzneiform kann an Mensch oder Tier über verschiedene Applikationswege angewendet werden. Dazu notwendige Applikationssysteme sind ebenso Teil der hier beschriebenen Erfindung.

-11-

Die Zusammensetzung der Nanopartikel beinhaltet ein schwer wasserlösliches Polymer, wobei es sich bevorzugt um ein bioabbaubares Polymer oder auch eine Mischung verschiedener bioabbaubarer Polymere handelt. Das bioabbaubare Polymer kann über einzelne Monomereinheiten beschrieben werden, welche mittels einer Polymerisation oder anderer Prozesse besagtes Polymer formen. Weiterhin kann das Polymer über seinen Namen definiert sein.

In einer Ausführung leitet sich das schwer wasserlösliche Polymer aus der Gruppe der natürlichen und/oder synthetischen Polymere bzw. aus Homo- und Co-Polymeren entsprechender Monomere ab. Insbesondere leitet sich das Polymer aus der Gruppe Alkylcyanoacrylate wie beispielsweise der Butylcyanoacrylate und der Isobutylcyanoacrylate, der Acrylate, wie der Methacrylate, der Lactide, beispielsweise der L-Lactide oder DL-Lactide, der Glycolide, der Caprolactone wie der ϵ -Caprolactone und anderer ab.

15

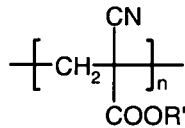
In einer weiteren Ausführung ist besagtes Polymer oder Teil des Polymers ausgewählt aus der Gruppe Polycyanoacrylate und Polyalkylcyanoacrylate (PACA) wie beispielsweise Polybutylcyanoacrylat (PBCA), Polyester wie beispielsweise Poly(DL-Lactide), Poly(L-Lactide), Polyglycolide, Polydioxanone, Polyoxazoline, Poly(Glycolide-co-Trimethylene-Carbonate), Polylactid-co-Glycolide (PLGA) wie beispielsweise Poly(L-Lactide-co-Glycolide) or Poly(DL-Lactide-co-Glycolide), Poly(L-lactide-co-DL-Lactide), Poly(Glycolide-co-Trimethylen), Poly(Carbonate-co-Dioxanone), Alginsäure, Hyaluronsäure, Polysialinsäure, saure Cellulose-Derivate, saure Stärke-Derivate, Polysaccharide wie beispielsweise Dextrane, Alginate, Cyclodextrine, Hyaluronsäure, Chitosane, saure Polyaminosäuren, polymere Proteine wie beispielsweise Collagen, Gelatine oder Albumin, Polyamide wie beispielsweise Poly(Asparaginsäure), Poly(Glutaminsäure), Polylysine, Poly(Iminocarbonate) (Poly(carbonate) abgeleitet von Tyrosin, Poly(β -Hydroxybutyrat), Polyanhydride wie beispielsweise Polysebacidsäure (Poly(SA)), Poly(adipinsäure), Poly(CPP-SA), Poly(CPH), Poly(CPM) aromatische Polyanhydride, Polyorthoester, Polycaprolactone wie beispielsweise Poly- ϵ - oder γ -Caprolactone, Polyphosphorsäure wie Polyphosphate, Polyphosphonate, Polyphosphazene,

-12-

Poly(amide-enamines), Azopolymers, Polyurethane, Polyorthoester, Dendrimere, Pseudopolymaminsäuren wie auch sämtliche Mischungen und Co-Polymere derselben Verbindungen.

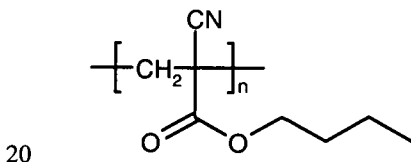
- 5 In einer bevorzugten Ausführung ist das schwer wasserlösliche Polymer aus der Gruppe der Polyalkylcyanoacrylate (PACA).

Den Aufbau dieser Polyalkylcyanoacrylate zeigt die angegebene Struktur (Formel 1), wobei es sich bei dem angegebenen Rest R bevorzugt um lineare und verzweigte Alkylgruppen mit 1 bis 16 Kohlenstoffatomen, eine Cyclohexyl-,
10 Benzyl- oder eine Phenylgruppe handelt.



Formel 1: Strukturformel PACA, n= 5 - 20000, bevorzugt n=5-6000, bzw. n=5-
15 100

In einer weiteren bevorzugten Ausführung ist das schwer wasserlösliche Polymer ein Polybutylcyanoacrylat (PBCA) (Formel 2).



Formel 2: Strukturformel PBCA; n= 5 - 20000 bevorzugt n=5-6000, bzw. n=5-
20 100

Das schwer wasserlösliche Polymer bildet im Sinne der Erfindung den größeren
25 Anteil der Polymermatrix der Partikel.

Überraschenderweise konnte gefunden werden, dass durch den Einbau von Verbindungen mit Aminogruppen, insbesondere einem kationischen Polymer, in

-13-

eine schwer wasserlösliche, feste Polymermatrix Nanopartikel mit einem kationisch geladenen Oberflächenpotential (Zetapotential) erzeugt werden.

In einer Ausführung leitet sich das kationische Polymer aus der Gruppe der natürlichen und/oder synthetischen Polymere bzw. aus Homo- und Co-Polymeren entsprechender Monomere ab.

Als kationische Polymere eignen sich im Sinne dieser Erfindung Polymere mit freien primären, sekundären oder tertiären Aminogruppen, die mit beliebigen niedermolekularen Säuren Salze bilden können, wobei die Salze in wässrig-organischen Lösungsmitteln löslich sind. Auch eignen sich Polymere oder deren Salze, die quartäre Ammoniumgruppen tragen und in organischen Lösungsmitteln löslich sind.

In einer bevorzugten Ausführung sind folgende Gruppen kationischer Polymere, Polykationen und Polyaminverbindungen bzw. Polymere aus Homo- und Co-Polymeren entsprechender Monomere besonders geeignet: Modifizierte natürliche kationische Polymere, kationische Proteine, synthetische kationische Polymere, Aminoalkane unterschiedlicher Kettenlänge, modifizierte kationische Dextrane, kationische Polysaccharide, kationische Stärke- oder Cellulosederivate, Chitosane, Guarderivate, kationische Cyanoacrylate, Methacrylate und Methacrylamide und solche Monomere und Comonomere die zur Bildung entsprechender geeigneter Verbindungen genutzt werden können und die entsprechenden Salze, welche sich mit geeigneten anorganischen oder niedermolekularen organischen Säuren bilden können.

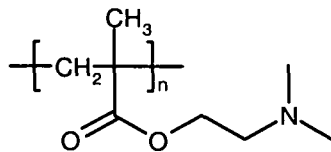
Dazu zählen insbesondere: Diethylaminoethylmodifizierte Dextrane, Hydroxymethylcellulose-trimethylamin, Polylysin, Protaminsulfat, Hydroxyethylcellulose-trimethylamin, Polyallylaminen, Protaminchlorid, Polyallylaminhydrosalze, Polyamine, Polyvinylbenzyltrimethylammoniumsalze, Polydiallyldimethylammoniumsalze, Polyimidazolin, Polyvinylamin und Polyvinylpyridin, Polyethylenimin (PEI), Putrescin (Butan-1,4-diamin), Spermidin (N-(3-Aminopropyl)butan-1,4-diamin), Spermin (N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin) Dimethylaminoethylacrylat, Poly-N,N-dimethylaminoethylmethacrylat Dimethylaminopropylacrylamid, Dimethylaminopropylmethacrylamid,

-14-

Dimethylaminostyrol, Vinylpyridin und Methylallylamin, Poly-DADMAC, Guar, deacetyliertes Chitin und die entsprechenden Salze, welche sich mit geeigneten anorganischen oder niedermolekularen organischen Säuren bilden können. Geeignete Säuren zur Salzbildung sind z. B.: Salzsäure, Schwefelsäure, insbesondere aber auch Essigsäure, Glycolsäure oder Milchsäure.

In einer Ausführung kann die aminogruppentragende Verbindung, insbesondere ein kationisches Polymer, in einem organischen Lösungsmittel, welches unbegrenzt mit Wasser mischbar ist, vorzugsweise Aceton, Methanol, Ethanol, Propanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), oder in einem Gemisch aus diesen Lösungsmitteln mit Wasser gelöst werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführung enthalten die Polymernanopartikel als Aminogruppen tragende Verbindung ein kationisch modifiziertes Polyacrylat (Poly-N,N-dimethylaminoethylmethacrylat, P(DMAEMA)) (Formel 3).



Formel 3: Strukturformel P(DMAEMA), n= 5 – 20000, bevorzugt n=5-6000, bzw. n=5-100

20

Das biologisch abbaubare, kationisch modifizierte Polyacrylat P(DMAEMA) wird in die Polymermatrix, insbesondere die PBCA-Polymermatrix, mittels Nanopräzipitation verkapselt. Die Oberfläche der resultierenden Nanopartikel weist aufgrund der Aminogruppen des kationischen Polymers ein positives (kationisches) Oberflächenpotential (Zetapotential) auf. Die kationische Partikeloberfläche gewährleistet eine gute Zellaufnahme und ermöglicht eine flexible elektrostatische Oberflächenmodifikation mit partiell anionisch geladenen Verbindungen.

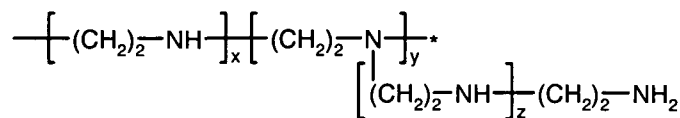
25

-15-

In einer anderen bevorzugten Ausführung enthalten die Polymernanopartikel als kationisches Polymer ein modifiziertes Polyacrylat Poly(Dimethylaminopropylmethacrylamid).

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführung enthalten die Polymernanopartikel als kationisches Polymer Polyethylenimin (PEI) verschiedener Molekulargewichte, insbesondere 1,8 kDa, 10 kDa, 70 kDa sowie 750 kDa, (Formel 4).

- 10 PEI ist ein im Bereich der nicht-viralen Gentherapie für DNA-Polyplexe (PEK) häufig verwendetes und dementsprechend viel untersuchtes Polykation [Remy J.-S. et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 1998; 30(1-3): 85-95].



- 15 Formel 4: Allgemeine Strukturformel für verzweigtes Polyethylenimin, wobei x, y und z = 10-50 %, bevorzugt x, y und z = 20-40% sind und in die Gesamtheit der Anteile 100% ergibt

- 20 Aufgrund der Verkapselung des kationischen Polyelektrolyten PEI in die PBCA-Polymermatrix besteht die Partikelhülle aus PEI-Polymerketten, welche ein kationisches Oberflächenpotential erzeugen.

- 25 Zusätzlich können erfindungsgemäß neben den zuvor genannten kationischen Polymeren bzw. Verbindungen mit Aminogruppen diagnostische aber auch therapeutische Substanzen in die Polymermatrix mittels Nanopräzipitation eingeschlossen werden.

- 30 Als diagnostische Substanzen zur Verkapselung können folgende Substanzklassen für unterschiedliche Molecular-Imaging-Methoden herangezogen werden, insbesondere sind hier Kontrastmittel oder Tracer für folgende Methode für molekulare Bildgebung (Molecular Imaging) zu nennen: die optische Bildgebung (Optical Imaging), wie z.B. DOT (diffuse optical

-16-

imaging), US (ultrasound imaging), OPT (optical projection tomography), Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Bildgebung, Fluoreszenz-Protein-Bildgebung und BLI (bioluminescence imaging) und die Magnetresonanztomographie (MRT, MRI) bzw. Röntgenbildgebung (X-ray). Es sind aber auch noch andere Methoden
5 denkbar. Die Verkapselung einer geeigneten diagnostischen Substanz aus genannten Substanzgruppen ermöglicht eine Detektion der Partikel in vitro und/oder in vivo.

In einer bevorzugten Ausführung handelt es sich bei dem diagnostischen Agens
10 um Farbstoffe, insbesondere ausgewählt aus folgender Gruppe: Fluorescein, Fluorescein-isothiocyanat, Carboxyfluorescein oder Calcein, Tetrabromfluoresceine oder Eosine, Tertaiodfluorescein oder Erythrosine, Difluorfluorescein, wie Oregon Green™ 488, Oregon Green™ 500 oder Oregon Green™ 514, Carboxyrhodol (Rhodol Green™)- Farbstoffe (US
15 5,227,487; US 5,442,045), Carboxyrodamin-Farbstoffe (Rhodamine Green™ Dyes) (US 5,366,860), 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacene, wie z.B. Dodipy FL, Bodipy 493/503 oder Bodipy 530/550 und Derivate davon (US 4,774,339; US 5,187,288; US 5,248,782; US 5,433,896; US 5,451,663), Polymethin-Farbstoffe, Coumarinfarbstoffe wie z.B. Coumarin 6, 7-Amino-4-
20 methylcoumarin, Metallkomplexe von DTPA oder Tetraazamacrozyklen (Cyclen, Pyvlen) mit Terbium oder Europium oder Tetrapyrrolfarbstoffe, insbesondere Porphyrine.

In einer besonders bevorzugten Ausführung handelt es sich bei der
25 diagnostischen Substanz um einen fluoreszenzaktiven Farbstoff.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführung handelt es sich bei dem diagnostischen Agens um einen fluoreszierenden Nah-Infrarot(NIR)-Farbstoff. Diese bevorzugt für Optical Imaging verwendeten NIR-Farbstoffe absorbieren
30 und emittieren Licht im NIR-Bereich zwischen 650 nm und 1000 nm. Die bevorzugten Farbstoffe gehören zur Klasse der Polymethinfarbstoffe und sind aus folgenden Gruppen ausgewählt: Carbocyanine wie beispielsweise Diethyloxacarbocyanin (DOC), Diethyloxadicarbocyanin (DODC),

-17-

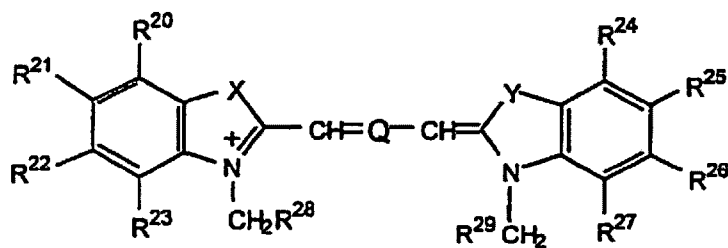
Diethyloxatricarbocyanin (DOTC), Indodi- oder Indotricarbocyanine, Tricarbocyanine, Merocyanine, Oxonolfarbstoffe (WO 96/17628), Rhodaminfarbstoffe, Phenoxazin- oder Phenothiazinfarbstoffe, Tetrapyrrolfarbstoffe, insbesondere Benzoporphyrine, Chorine und
 5 Phthalocyanine.

Die genannten und in dieser Erfindung bevorzugten Farbstoffe können entweder als Säuren oder als Salze eingesetzt werden. Geeignete anorganische Kationen bzw. Gegenionen für diese Farbstoffe sind
 10 beispielsweise das Lithiumion, das Kaliumion, das Wasserstoffion und insbesondere das Natriumion. Geeignete Kationen organischer Basen sind unter anderem solche von primären, sekundären oder tertiären Aminen, wie zum Beispiel Ethanolamin, Diethanolamin, Morpholin, Glucamin, N,N-Dimethylglucamin und insbesondere N-Methylglucamin und Polyethylenimin.
 15 Geeignete Kationen von Aminosäuren sind beispielsweise die des Lysins, des Arginins und des Ornithins sowie die Amide ansonsten saurer oder neutraler Aminosäuren.

Ebenso können die bevorzugten Farbstoffe können als Basen oder als Salze von diesen eingesetzt werden.

20

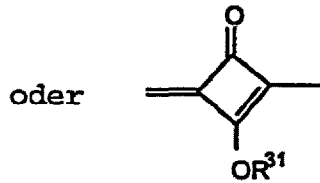
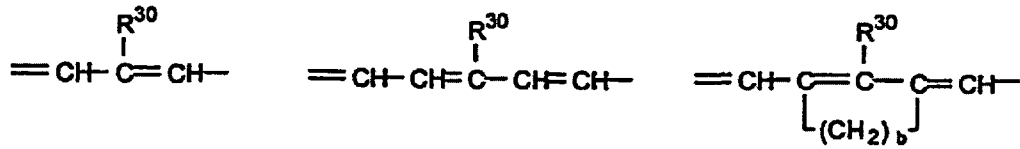
In einer ganz besonders bevorzugten Ausführung handelt es sich bei der diagnostischen Substanz um einen Carbocyanin-Farbstoff. Die allgemeine Struktur der Carbocyanine wird wie folgt beschrieben (Formel 8).



25

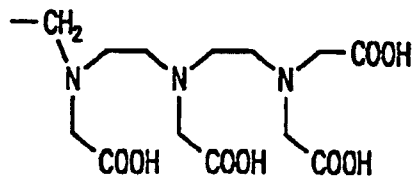
wobei Q ein Fragment

-18-

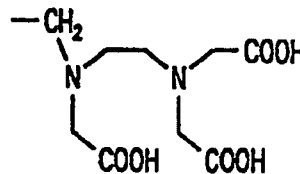


- wobei R³⁰ für ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, eine Carboxygruppe, einen Alkoxyrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder ein Chloratom steht, R³¹ für ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht,
- 5 X und Y unabhängig voneinander für ein Fragment -O-, -S-, -CH=CH- oder -C(CH₂R³²)(CH₂R³³)- stehen, R²⁰ bis R²⁹, R³² und R³³ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, einen Carboxy-, einen Sulfonsäure-Rest oder einen Carboxyalkyl-, Alkoxy-carbonyl- oder Alkoxyoxoalkyl- Rest mit bis zu 10 C-Atomen oder ein Sulfoalkylrest mit bis zu 4 C-Atomen, oder für ein nicht spezifisch bindendes Makromolekül, oder für einen Rest der allgemeinen Formel VI
- 10 $-(\text{O})_v-(\text{CH}_2)_o-\text{CO}-\text{NR}^{34}-(\text{CH}_2)_s-(\text{NH}-\text{CO})_q-\text{R}^{35}$ (VI) steht,
- 15 mit der Massgabe, dass bei der Bedeutung von X und Y gleich O, S, -CH=CH- oder -C(CH₃)₂- mindestens einer der Reste R²⁰ bis R²⁹ einem nicht spezifisch bindenden Makromolekül oder der allgemeinen Formel VI entspricht, wobei
- o und s gleich 0 sind oder unabhängig voneinander für eine ganze Zahl von 1 bis 6 stehen,
- 20 q und v unabhängig voneinander für 0 oder 1 stehen, R³⁴ ein Wasserstoffatom oder einen Methylrest darstellt, R³⁵ ein Alkylrest mit 3 bis 6 C-Atomen, welcher 2 bis n-1 Hydroxygruppen aufweist, wobei n die Anzahl der C-Atome ist, oder ein mit 1 bis 3
- 25 Carboxygruppen substituierter Alkylrest mit 1 bis 6 C-Atomen, Arylrest mit 6 bis 9 C-Atomen oder Arylalkylrest mit 7 bis 15 C-Atomen, oder ein Rest der allgemeinen Formel III d oder III e

-19-



(III d)



(III e)

ist, unter der Massgabe, dass q für 1 steht,

oder ein nicht spezifisch bindendes Makromolekül bedeutet,

R^{20} und R^{21} , R^{21} und R^{22} , R^{22} und R^{23} , R^{24} und R^{25} , R^{25} und R^{26} , R^{26} und R^{27}

- 5 zusammen mit den zwischen ihnen liegenden Kohlenstoffatomen einen 5- oder 6- gliedrigen aromatischen oder gesättigten annelierten Ring bilden, sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

Formel 8: Allgemeine Struktur der Carbocyanine

- 10 Im Falle der Carbocyanine wird Bezug auf die Anmeldungen DE 4445065 und DE 69911034 genommen, deren Inhalt hiermit Gegenstand dieser Anmeldung sein soll.

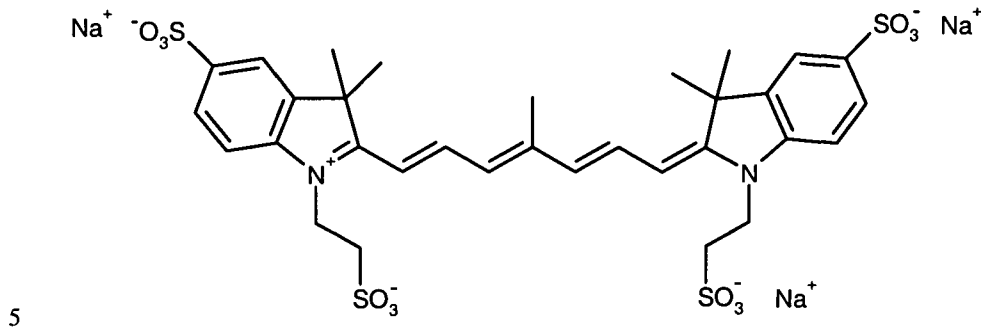
- 15 Unerwarteterweise können anionische, gut wasserlösliche Substanzen wie bestimmte Carbocyanine in die hydrophobe Polymermatrix der beschriebenen Nanopartikel stabil eingeschlossen werden.

- Im Sinne der Erfindung wird eine anionische wasserlösliche Substanz mittels Ionenkomplexbildung und Co-Präzipitation mit einem kationischem Polymer in einer schwer wasserlöslichen Polymermatrix durch Nanopräzipitation verkapselt,
20 wobei Partikel definierter Größe entstehen.

- Durch den Einbau eines NIR-aktiven Fluoreszenzfarbstoffes in die Polymermatrix der Partikel sind diese mittels Optical Imaging nicht-invasiv im Gewebe über Fluoreszenz detektierbar. Es besteht damit in vivo die Möglichkeit,
25 die Verteilung bzw. Anreicherung fluoreszenzmarkierter Nanopartikel zu detektieren.

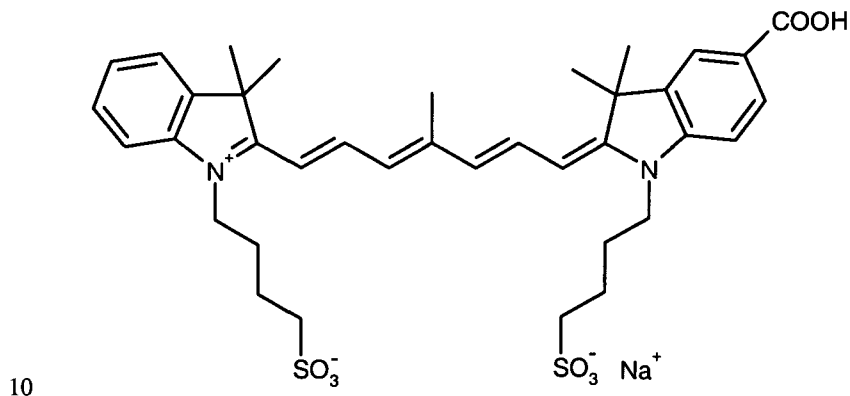
-20-

In einer besonders bevorzugten Ausführung handelt es sich bei dem Carboxyanin-Farbstoff um das gut wasserlösliche anionische Tetrasulfocyanin (TSC) (Formel 9).



Formel 9: Tetrasulfocyanin / TSC

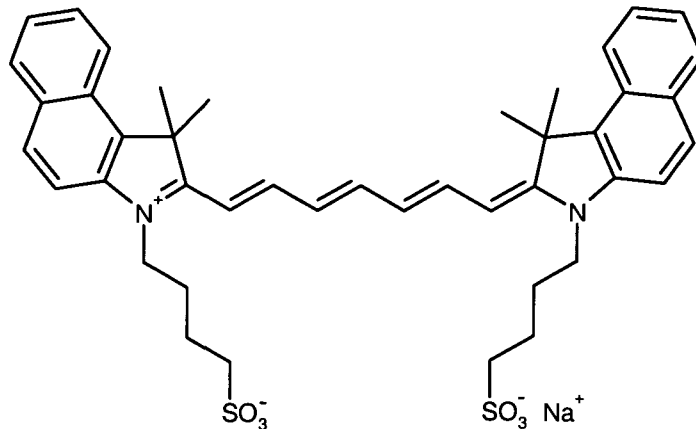
In einer anderen besonders bevorzugten Ausführung handelt es sich bei dem Carboxyanin-Farbstoff um IDCC (Indodicarbocyanin) (Formel 10).



Formel 10: Indodicarbocyanin / IDCC

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführung handelt es sich bei dem Carboxyanin-Farbstoff um ICG (Indocyaningrün) (Formel 11).

-21-



Formel 11: Indocyaningrün (ICG)

In einer Ausführung handelt es sich bei der verkapselten pharmazeutisch
 5 aktiven Substanz um ein therapeutisches Agens .

In einer bevorzugten Ausführung handelt es sich bei dem therapeutischen Agens um eine Substanz zur Therapie von Tumorerkrankungen, insbesondere vaskularisierten Tumoren und Metastasen, oder Erkrankungen mit
 10 Entzündungsreaktionen. Bei letzterem kann es sich beispielsweise um Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, wie z. B. Rheumatoide Arthritis, Psoriasis Arthritis, Kollagenosen, Vaskulitiden und Infektarthritiden handeln. Weitere Erkrankungen mit entzündlichen Prozessen und möglichen Gewebsveränderungen sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen
 15 (Morbus Chron, Colitis Ulcerosa), Multiple Sklerose, Atopische Dermatitis wie auch bestimmte Erythema-Erkrankungen. Als therapeutische Substanzen können insbesondere folgende Gruppen herangezogen werden: immunogene Peptide oder Proteine, chemotherapeutische Agenzien, Toxine, radiotherapeutische Agenzien, Radiosensibilisatoren, Angiogenese-Inhibitoren
 20 und antientzündlich wirksame Substanzen wie NSAIDs oder eine Kombination aus diesen.

Die therapeutischen Agenzien zur Behandlung von Tumorerkrankungen können ausgewählt sein aus der Gruppe der Alkylanzien, insbesondere Bendamustin,
 25 Busulfan, Carmustin, Chlorambucil, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Lomustin,

-22-

Melphalan, Nimustin, Thiotepa, Treosulfan und Trofosamid, der Gruppe der Antimetaboliten, insbesondere Cytarabin, Fludarabin, Fluorouracil, Gemcitabin, Mercaptopurin, Methotrexat und Tioguanin, der Gruppe der Alkaloide und Diterpene, insbesondere Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Vinorelbin, Etoposid, und Docetaxel, Paclitaxel, die Gruppe der Taxane, der Gruppe der Antibiotika, insbesondere Aclarubicin, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitomycin, Mitoxantron, der Gruppe der Platin Verbindungen, insbesondere Carboplatin und Cisplatin, der Gruppe der Hormone und Hormonagonisten, insbesondere Testolacton, Fosfestrol, Tamoxifen, Cyproteron Flutamid, Buserelin, Gonadorelin, Goserelin, Leuprorelin, Nafarelin, Triptorelin und Octreotid und der Gruppe der VEGF-Inhibitoren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführung handelt es sich bei dem therapeutischen Agens um Substanzen, welche zur Therapie von Entzündungen geeignet sind. Sie sind insbesondere ausgewählt aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), insbesondere Salizylate (unter anderem Acetylsalicylsäure), Arylessigsäurederivate (unter anderem Acemetacin, Diclofenac), Propionsäurederivate (unter anderem Ibuprofen, Ketoprofen, Naproxen, Tiaprofen), Indol-Derivate (unter anderem Indometacin, Acemetacin, Lonazolac, Proglumetacin), Oxicame (unter anderem Piroxicam, Tenoxicam), Alkalone (unter anderem Nabumeton), Pyrazolone (unter anderem Azapropazon, Pyrazinobutazon, Phenylbutazon, Oxyphenbutazon), Anthranilsäurederivate (unter anderem Mefenaminsäure, Nifluminsäure), COX 2 Hemmer (unter anderem Meloxicam, Celecoxib, Rofecoxib) und eine Kombination von NSAR und anderen Medikamenten (unter anderem die Kombination aus Diclofenac und Misoprostol), der Gruppe der Glukokortikoide, insbesondere Betamethason, Budesonid, Cloprednol, Cortison, Deflazacort, Dexamethason, Fluocortolon, Hydrocortison, Methylprednisolon, Prednisolon, Prednison, Prednyliden, Triamcinolon, Beclometason, Flunisolid, Fluticason, Alclometason, Amcinonid, Clobetasol, Clobetason, Clocortolon, Desonid, Desoximetason, Diflorason, Diflucortolon, Fludroxycortid, Flumetason, Fluocinolon, Fluocinonid, Fluocortin, Flupredniden, Halcinonid, Halometason, Mometason, Prednicarbat, Fluorometholon, Medryson, Cortisol (Hydrocortison),

-23-

Amcinonid, Rimexolon, der Gruppe der langwirksame Antirheumatika, insbesondere Chloroquin, Hydroxychloroquin, Sulfasalazin (Salazosulfapyridin), Adalimumab, Anakinra, Etanercept, Infliximab, D-Penicillamin, die Gruppe der Immunsuppressiva, insbesondere Azathioprin, Methotrexat, Mycophenolat mofetil, Cyclosporin A, Cyclophosphami, Chlorambucil und Leflunomid, und die Gruppe der Antibiotika, insbesondere die Penicilline (unter anderem Ampicillin, Piperacillin, Amoxicillin Clavulansäure, Tazobaktam, Apalzillin, Penicillin G, Oxacillin, Flucloxacillin, Mezlocillin, Phenoxymethylpenezillin), die Cephalosporine (unter anderem Cefotaxim, Cefoxitin, Cefotiam, Cefepim, Ceftazidim, Ceftriaxon, Cefuroxim, Cefamandol, Cefazolin), die Carbapeneme (unter anderem Imipenem, Carbapeneme, Cilastin, Meropenem), die Chinolone (unter anderem Moxifloxacin, Levofloxacin, Ciprofloxacin), die Aminoglykoside (unter anderem Gentamycin, Amikacin, Netilmycinsulfat, Tobramycin, Gentamycin), die Makrolide (unter anderem Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin, Roxithromycin), die Monobactame (unter anderem Aztreonam), die Glykopeptide (unter anderem Vancomycin, Teicoplanin) und andere Antibiotika (unter anderem Doxycyclin, Clindamycin, Ofloxacin, Chloramphenicol, Amphotericin B, Flucytosin, Metronidazol, Fusidinsäure, Fosfomycin.

20

In einer bevorzugten Ausführung handelt es sich bei den Polymernanopartikeln um Fällungsaggregate, welche durch Nanopräzipitation hergestellt werden.

Hierfür stehen insbesondere folgende Herstellungsmethoden zur Verfügung:

- Direkte Fällung (Präzipitation) in einem Reagenzglas durch Einbringen des gelösten Polymer-Substanz-Gemisches in eine tensidhaltige wässrige Lösung, welche mittels Magnetrührer durchmischt wird.
- Fällung des Polymer-Substanz-Gemisches in der tensidhaltigen wässrigen Lösung durch Zusammenführung der beiden Lösungen mittels eines Micro-Mischer-Systems.
- Verwendung von Ultraschall zur gleichmäßigen Verteilung des Polymer-Substanz-Gemisches in der tensidhaltigen wässrigen Lösung.

30

-24-

Bei der Herstellung von Nanopartikeln mittels Nanopräzipitation wird das organische Lösungsmittel schlagartig dem Matrixpolymer und den mit ihm gelösten Substanzen entzogen, wenn die polymerhaltige organische Lösung in ein deutlich größeres Volumen einer wässrigen Lösung gegeben wird.

5 Überraschenderweise werden in der Polymerphase gelöste Verbindungen mit Aminogruppen (wasserlösliche als auch wasserunlösliche) in dem schwer löslichen Polymer während der Fällung coverkapselt. Bedingung dafür ist die unbegrenzte Mischbarkeit des organischen Lösungsmittels (z. B. Aceton, Ethanol) mit Wasser sowie die Unlöslichkeit des Matrixpolymers in der

10 wässrigen Phase.

In einer bevorzugten Ausführung für alle vorhergehenden Polymernanopartikel ist die Oberfläche der Polymernanopartikel elektrostatisch modifiziert.

15 Die elektrostatische Modifikation der kationischen Nanopartikeloberfläche ist ein herausragender Vorteil der vorliegenden Erfindung. Auf der Basis ionischer Wechselwirkungen kann ohne eine chemische Kopplungsreaktion die Partikeloberfläche mit einer geeigneten Substanz modifiziert werden. Voraussetzung dafür ist, dass das modifizierende Agens partiell über Ladungen

20 verfügt, welche entgegengesetzt der Partikeloberflächenladung sind. Damit erlaubt diese Methode (elektrostatische Oberflächenmodifikation mittels Ladungstitration) eine einfache, flexible und vielseitige Modifikation der Partikeloberfläche.

Zusätzlich ist es möglich, instabile Wirkstoffe auf der Partikeloberfläche zu

25 adsorbieren, welche dadurch vor dem Abbau durch Enzyme geschützt sind und dementsprechend einen höheren therapeutischen Effekt erzielen können.

Die Anreicherung (aktives und passives Targeting) von Nanopartikeln aus dem Blutstrom in das Zielgewebe setzt voraus, dass die Partikel ausreichend lange

30 im Blutstrom zirkulieren. Erfindungsgemäß kann mittels der zuvor beschriebenen Oberflächenmodifikation die Zirkulationszeit im Körper individuell angepasst werden, insbesondere durch Verwendung von Polyethylenoxiden oder Polythylenglycolen (siehe Beispiel 5).

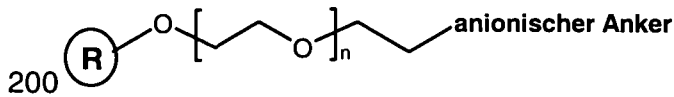
Ein weiterer herausragender Vorteil besteht darin, dass die hier beschriebene elektrostatische Oberflächenmodifikation direkt vor der Anwendung schnell und unproblematisch durchgeführt werden kann. Dies geschieht durch ein einfaches
5 Mischen geeigneter Mengen der Nanopartikeldispersion mit dem modifizierendem Agens.

Damit besteht zusätzlich die Möglichkeit, den Kernpartikel separat vom oberflächenmodifizierendem Agens herzustellen und zu lagern. Dies ist zum einen besonders vorteilhaft für die kolloidale Langzeitstabilität. Zum anderen
10 können extrem labile oberflächenmodifizierende Substanzen wie Peptide oder Antikörper unter geeigneten Bedingungen bis zur Verwendung aufbewahrt werden.

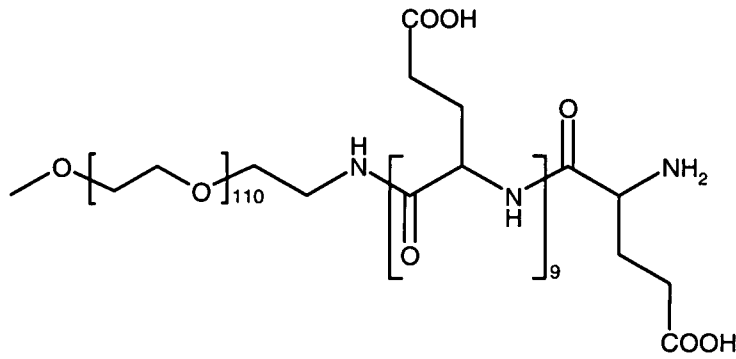
Die Trennung von Kernpartikel und modifizierendem Agens ermöglicht weiterhin eine Oberflächenmodifikation entsprechend den individuellen Anforderungen
15 beim Patienten. Die Oberflächenmodifikation nach einem Baukastenprinzip bietet dabei maximale Flexibilität für Diagnose, Therapie und Monitoring, wobei die unkomplizierte Durchführung der Modifikation direkt durch den Anwender erfolgt.

20 Ein bevorzugter Aufbau des oberflächenmodifizierenden Agens für kationisch funktionalisierte Polymernanopartikel, insbesondere die beschriebenen PBCA-Nanopartikel, ist in Formel 5 dargestellt. Der partiell anionisch geladene Molekülteil erfüllt die Funktion eines Ankers auf der positiv geladenen Partikeloberfläche durch elektrostatische Wechselwirkungen. Der neutrale, zum
25 umgebenden wässrigen Medium ausgerichtete Molekülteil besteht aus Polyethylenglycol und/oder Polyethylenoxid-Einheiten (PEG-Einheiten) unterschiedlicher Länge. Bevorzugt sind hier PEG-Ketten mit einem Molekulargewicht von 100 bis 30000 Dalton und besonders bevorzugt mit 3000 bis 5000 Dalton. Dieser Molekülteil kann alternativ auch aus anderen
30 geeigneten Strukturen, wie z. B. Hydroxyethylstärke (HES) und allen daraus möglichen polymeren Verbindungen, bestehen. Bei dem Rest R handelt es sich bevorzugt um Wasserstoff oder eine Methyl-Einheit.

Formel 5: Allgemeine Strukturformel eines oberflächenmodifizierenden Agens
 (R = H, CH₃), n=5-700, bevorzugt n=5-



5 In einer besonders bevorzugten Ausführung ist die Oberfläche des Polymernanopartikels mit Glu(10)-b-PEG(110) modifiziert (Formel 6). Als negativer Molekülteil (Anker) dienen die Carboxylat-Gruppen der Glutaminsäure-Untereinheiten des Blockcopolymers.

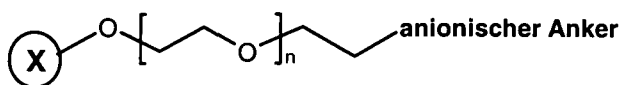


Formel 6: Strukturformel von Glu(10)-b-PEG(110);

In einer besonders bevorzugten Ausführung ist eine Zielstruktur vorhanden.

15 Diese Zielstruktur besitzt mindestens einen negativ geladenen Molekülteil, welcher durch elektrostatische Wechselwirkungen auf die kationische Partikeloberfläche aufgebracht wird.

20 Ein weiterer besonders bevorzugter Aufbau des oberflächenmodifizierenden Agens für kationisch funktionalisierte Polymernanopartikel, insbesondere die beschriebenen PBCA-Nanopartikel, ist in Formel 7 dargestellt.



-27-

Formel 7: Allgemeine Strukturformel eines oberflächenmodifizierenden Agens, n=5-700, bevorzugt n=5-200

Der partiell anionisch geladene Molekülteil erfüllt die Funktion eines Ankers auf
5 der positiv geladenen Partikeloberfläche durch elektrostatische Wechselwirkungen. Der mittlere, neutrale Molekülteil besteht aus Polyethylenglycol-Einheiten und/oder Polyethylenoxid-Einheiten (PEG-Einheiten) unterschiedlicher Länge. Bevorzugt sind hier PEG-Ketten mit einem Molekulargewicht von 100 bis 30000 Dalton und besonders bevorzugt mit 3000
10 bis 5000 Dalton. Dieser Molekülteil kann alternativ auch aus anderen geeigneten Strukturen, wie z. B. Hydroxyethylstärke (HES) und allen daraus möglichen polymeren Verbindungen, bestehen.

Der Ligand X des oberflächenmodifizierenden Agens, im weiteren auch Zielstruktur genannt, dient zur Verbesserung von passiven und aktiven
15 Anreicherungsmechanismen der Polymernanopartikel.

Geeignete Liganden als Zielstrukturen können sowohl Antikörper, Peptide, Rezeptor-Liganden von Liganden-Mimetika oder ein Aptamer sein. Als
20 Strukturen kommen Aminosäuren, Peptide, CDR (complementary determining regions), Antigene, Haptene, Enzymsubstanzen, Enzym-Cofaktoren, Biotin, Carotinoide, Hormone, Vitamine, Wachstumsfaktoren, Lymphokine, Carbohydrate, Oligosaccharide, Lecitine, Dextrane, Lipide, Nucleoside wie beispielsweise ein DNA- oder ein RNA-Molekül enthaltend native, modifizierte oder artifizielle Nucleoside, Nucleinsäuren, Oligonucleotide, Polysaccharide, B-,
25 A-, Z-Helix oder Haarnadelstruktur (Hairpin), eine chemische Einheit, modifizierte Polysaccharide als auch rezeptorbindende Substanzen oder Fragmente davon in Betracht. Zielstrukturen können auch Transferrin oder Folsäure oder Teile davon sein oder alle möglichen Kombinationen aus den vorgenannten.

30

Diese Liganden werden erfindungsgemäß über elektrostatische Wechselwirkungen an die Nanopartikel gebunden, es ist aber auch möglich, die Liganden über kovalente Bindungen an die Partikeloberfläche zu binden.

-28-

Weiterhin ist es möglich, einen Linker zwischen Ligand und Nanopartikel einzubauen.

Die elektrostatische Anlagerung der Zielstrukturen erfolgt über
5 Ladungswechselwirkungen mit mindestens einem negativ geladenen Molekülteil an die kationische Partikeloberfläche. Als negativ geladener Molekülteil (Anker) eignen sich insbesondere Verbindungen insbesondere Gruppen wie Acetat-, Carbonat-, Citrat, Succinat-, Nitrat-, Carboxylat-, Phosphat-, Sulfonat- oder Sulfat-Gruppen, sowie Salze und freie Säuren dieser Gruppen.

10

In einer Ausführung beträgt die Größe der Nanopartikel zwischen 1 nm – 800 nm.

In einer bevorzugten Ausführung beträgt die Größe der Nanopartikel zwischen
15 5 nm - 800 nm.

In einer bevorzugten Ausführung beträgt die Größe der Nanopartikel zwischen 1 nm – 500 nm.

20 In einer bevorzugten Ausführung beträgt die Größe der Nanopartikel zwischen 1 nm – 300 nm.

In einer besonders bevorzugten Ausführung beträgt die Größe der Nanopartikel zwischen 5 nm - 500 nm.

25

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführung beträgt die Größe der Nanopartikel zwischen 5 nm - 300 nm.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführung beträgt die Größe der
30 Nanopartikel zwischen 10 nm - 300 nm.

Die Größe der entstandenen Polymernanopartikel wird mittels der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ermittelt.

In einer besonders bevorzugten Ausführung sind die Polymernanopartikel durch die Durchführung folgender Verfahrensschritte gekennzeichnet:

- 5 • Das wasserunlösliche Polymer wird in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, welches unbegrenzt mit Wasser mischbar ist, vorzugsweise Aceton, Methanol, Ethanol, Propanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), oder in einem Gemisch aus diesen Lösungsmitteln mit Wasser gelöst.
- 10 • Das kationische Polymer wird in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, welches unbegrenzt mit Wasser mischbar ist, vorzugsweise Aceton, Methanol, Ethanol, Propanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), oder in einem Gemisch aus diesen Lösungsmitteln mit Wasser gelöst.
- 15 • Der Wirkstoff (Diagnostikum oder Therapeutikum) wird in einem organischen Lösungsmittel, welches unbegrenzt mit Wasser mischbar ist, vorzugsweise Aceton, Methanol, Ethanol, Propanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), oder in einem Gemisch aus diesen Lösungsmitteln mit Wasser gelöst.
- 20 • Es wird eine vollständig homogene Lösung aus kationischem Polymer, wasserunlöslichem Polymer und Wirkstoff hergestellt.
- Durch ein Einbringen des gelösten Polymer-Substanz-Gemisches in eine tensidhaltige Lösung, als Tensid insbesondere Pluronic F68, Triton X-100 und Synperonic T707, wird die spontane Bildung eines kolloidalen Fällungsaggregats herbeigeführt.
- 25 • Das organische Lösungsmittel wird anschließend entweder unter Atmosphärendruck oder Unterdruck, über Lyophilisation oder Hitze vollständig oder andere geeignete Methoden entfernt.
- 30 • Zur Modifikation der Partikeloberfläche wird die wässrige, stabile Nanopartikeldispersion in einem geeigneten Mengenverhältnis mit dem in Wasser gelösten modifizierenden Agens vermischt. Die Bestimmung des geeigneten Mengenverhältnisses erfolgt durch schrittweise Titration der Partikeldispersion mit dem modifizierenden Agens. Das Ausmaß der elektrostatischen Oberflächenmodifikation (Ladungstitration) wird durch Bestimmung des Zetapotentials kontrolliert.

-30-

Die beschriebenen Nanopartikel können unter Verwendung geeigneter pharmazeutischer Zusatzstoffe zu verschiedenen Arzneiformen weiterverarbeitet werden, welche sich zur Applikation an Mensch oder Tier eignen. Dazu zählen insbesondere wässrige Dispersionen, Lyophilisate, feste orale Arzneiformen wie schnell auflösende Tabletten, Kapseln und andere. Geeignete pharmazeutische Zusatzstoffe können sein: Zuckeralkohole zur Lyophilisation (z. B. Sorbitol, Mannitol), Hilfsstoffe zur Tablettierung, Polyethylenglycole etc.

10

Die Applikation der wässrigen Nanopartikeldispersion oder einer weiter entwickelten Arzneiform kann oral, parenteral (intra venös), subkutan, intramuskulär, intraokular, intrapulmonal, nasal, intraperitoneal, dermal sowie auf allen anderen für Mensch oder Tier möglichen Applikationswegen angewendet werden.

15

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Polymernanopartikels, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Verfahrensschritte durchgeführt werden:

- Lösen des kationischen Polymers in einem organischen Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch mit Wasser
- Lösen des wasserunlöslichen Polymers in einem organischen Lösungsmittel
- Lösen des Wirkstoffes (Diagnostikum oder Therapeutikum) in einem organischen Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch mit Wasser,
- Herstellen eines vollständig gelösten Gemisches aus kationischem Polymer, wasserunlöslichem Polymer und Wirkstoff
- Einbringen des Gemisches in eine tensidhaltige Lösung, wobei es zur spontanen Bildung von Fällungsaggregaten kommt,
- Entfernen des Lösungsmittels.
- Elektrostatische Oberflächenmodifikation der Partikel durch Zusammenfügen von Nanopartikeldispersion und modifizierendem Agens in geeigneten Mengen (Fakultativ).

20
25
30

Definitionen

- 5 Der Begriff "Wirkstoff", wie hier verwendet, umfasst therapeutisch und diagnostisch wirksame Verbindungen. Ebenso umfasst sind Verbindungen, die bei anderen Tieren als dem Menschen und bei Pflanzen wirksam sind.

Der Begriff "Matrixpolymer", wie hier verwendet, beschreibt das Polymer,
10 welches mengenmäßig den größeren Anteil der Partikelmasse bildet, wobei weitere verkapselte Substanzen (sowohl beliebige Zusatzstoffe als auch pharmazeutisch aktive Substanzen) gleichmäßig und/oder ungleichmäßig eingebettet sein können.

- 15 Der Begriff „(Nano)-Präzipitation“, wie hier verwendet, beschreibt die Bildung eines kolloidalen Niederschlags durch Ausfällen eines schwer wasserlöslichen Polymers beim Einbringen in eine wässrige Phase, wobei eine Durchmischung der Lösungsmittel stattfindet. Im Falle einer Co-Präzipitation kommt es zu einer gemeinschaftlichen Ausfällung mehrerer Substanzen, welche im Sinne der
20 Erfindung sowohl wasserlöslich als auch schwer wasserlöslich sein können.

Ein „Fällungsaggregat“, wie hier verwendet, entsteht im Zuge der Nanopräzipitation. Dieses Fällungsaggregat besteht erfindungsgemäß aus einem Matrixpolymer, worin weitere polymere Substanzen wie auch
25 pharmazeutisch aktive Substanzen teilweise oder vollständig eingebettet sein können. Es kann hierbei eine gleichmäßige oder ungleichmäßige Verteilung der co-verkapselten Substanzen im Matrixpolymer vorliegen.

Ein "Anker", wie hier verwendet, beschreibt eine ionische Teilstruktur des
30 modifizierenden Agens, welche die Immobilisierung und somit Lokalisation des modifizierenden Agens auf der geladenen Partikeloberfläche durch ionische Wechselwirkungen zwischen entgegengesetzt geladenen Verbindungen ermöglicht.

Ladungstitration beschreibt den über Zetapotentialmessung nachvollziehbaren Prozess der elektrostatischen Kopplung des Ankers auf der Partikeloberfläche. Der geladene Anker verändert dabei das Zetapotentials des Partikels hin zur
5 Ladung des Ankers.

Tenside im Sinne der Erfindung sind zum einen oberflächenaktive Substanzen, welche die Grenzflächenspannung zwischen zwei nicht mischbaren Phasen erniedrigen, wodurch eine Stabilisierung kolloidaler Dispersionen möglich ist.
10 Weiterhin kann es sich bei Tensiden erfindungsgemäß um jede Art von Substanzen handeln, welche in der Lage sind, kolloidale Dispersionen sterisch und / oder elektrostatisch zu stabilisieren.

Der Begriff „aktives Targeting“ wird verwendet, wenn gewebes- oder
15 zellspezifische Liganden für eine gezielte Anreicherung zum Einsatz kommen. Aktive Liganden können sowohl an Wirkstoffen direkt (Ligand-Wirkstoff-Konjugate) als auch auf die Oberfläche kolloidaler Trägersysteme gekoppelt werden.

Der Begriff „passives Targeting“ wird verwendet, wenn sich die Verteilung des Wirkstoffs aufgrund (unspezifischer) physikalischer, biochemischer oder immunologischer Vorgänge ergibt. In erster Linie wird der Enhanced Permeation and Retention-Effekt (kurz EPR- Effekt) dafür verantwortlich gemacht. Es handelt sich hierbei um einen passiven Anreicherungsmechanismus, welcher
25 die strukturellen Besonderheiten von tumorösem oder auch entzündetem Gewebe ausnutzt [Ulbrich K., Subr V., Adv. Drug Deliv. Rev., 2004; 56(7): 1023-1050].

Der Begriff "Oberflächenpotential", auch als Oberflächenladung bezeichnet, ist
30 gleichbedeutend mit dem Begriff "Zetapotential". Dieses Zetapotential wird mittels der Methode der Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) bestimmt.

-33-

Das Oberflächenpotential, auch als Zetapotential bezeichnet, gibt das Potential eines wandernden Teilchens an der Scherebene an, d. h. wenn durch Bewegung des Teilchens der größte Teil der diffusen Schicht abgeschert worden ist. Das Oberflächenpotential wurde mit dem Verfahren der Laser-
5 Doppler-Anemometrie unter Verwendung eines "Zetasizer 3000" (Malvern Instruments) bestimmt.

Mittels der Methode der Laser-Doppler-Anemometrie wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel im elektrischen Feld bestimmt.
10 Teilchen mit einer geladenen Oberfläche wandern in einem elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel von der Menge der Oberflächenladungen und der angelegten Feldstärke abhängig ist. Zur Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit werden im elektrischen Feld
15 wandernde Teilchen mit einem Laser bestrahlt und das gestreute Laserlicht detektiert. Durch die Bewegung der Teilchen wird eine Frequenzverschiebung beim reflektierten Licht im Vergleich zum eingestrahlten Licht gemessen. Der Betrag dieser Frequenzverschiebung ist abhängig von der Wanderungsgeschwindigkeit und wird als so genannte Doppler-Frequenz
20 bezeichnet (Doppler-Effekt). Aus der Doppler-Frequenz, dem Streuwinkel und der Wellenlänge kann die Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens abgeleitet werden. Die elektrophoretische Mobilität ergibt sich aus dem Quotienten der Wanderungsgeschwindigkeit und der elektrischen Feldstärke. Das Produkt aus elektrophoretischer Mobilität und dem Faktor 13 entspricht
25 dem Zetapotential, dessen Einheit [mV] ist.

Die Messungen (n=5) wurden mit einem Zetasizer Advanced 3000 und einem Zetamaster der Firma Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, England) nach Verdünnen in elektrolytarmen Dispersionsmedium (MilliQ Wasser:
30 Widerstandswert 18,2 M Ω .cm, 25 °C und TOC-Gehalt (gesamter organischer Kohlenstoff) <10 ppb) und unter definiertem pH Wert (pH 6,8-7,0) durchgeführt. Als Software wurden PCS V1.41/ PCS V1.51 Rev. verwendet. Die Kontrollmessungen des Zetapotentials erfolgten mit Latex-Standardpartikeln der

-34-

Firma Malvern Instruments Ltd. ($-50 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$). Die Messungen wurden unter den Standardeinstellungen der Firma Malvern Instruments Ltd. durchgeführt.

Die Größe der Nanopartikel wurde mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung
5 (Dynamic Light Scattering, DLS) unter Verwendung eines "Zetasizer 3000"
(Malvern Instruments) bestimmt. Zusätzlich wurden Aufnahmen im Raster-
Elektronen-Mikroskop (REM) gemacht, wie in Fig. 12 beispielhaft gezeigt wird.
Die Figur 12 (Fig. 12) bestätigt auch die kugelförmige Gestalt der Nano-partikel.

10 Die Bestimmung der Partikelgröße durch DLS beruht auf dem Prinzip der
Photonenkorrelationsspektroskopie (Photon Correlation Spectroscopy, PCS).
Dieses Verfahren eignet sich zur Vermessung von Partikeln mit einer Größe im
Bereich von 3 nm bis 3 μm . Die Partikel unterliegen in Lösung einer
ungerichteten Bewegung, ausgelöst durch die Kollision mit
15 Flüssigkeitsmolekülen des Dispersionsmittels, deren treibende Kraft die
Brown'sche Molekularbewegung ist. Die resultierende Bewegung der Partikel ist
umso schneller, je kleiner ihr Partikeldurchmesser ist. Wird eine Probe in einer
Küvette mit Laserlicht bestrahlt, so kommt es an den sich ungerichtet
bewegenden Partikeln zur Streuung des Lichts. Durch diese Bewegung der
20 Partikel ist die Streuung nicht konstant, sondern schwankt über die Zeit. Die im
90°-Winkel detektierten Schwankungen der Intensität des gestreuten Laserlichts
sind umso stärker, je schneller sich die Partikel bewegen, d.h. je kleiner sie
sind. Auf der Grundlage dieser Intensitätsschwankungen kann man mit Hilfe
einer Autokorrelationsfunktion auf die Partikelgröße schließen. Der mittlere
25 Teilchendurchmesser wird aus dem Abfall der Korrelationsfunktion berechnet.
Zur korrekten Berechnung des mittleren Teilchendurchmessers sollten die
Partikel eine kugelförmige Gestalt haben, was sich durch REM-Aufnahmen
überprüfen lässt (siehe oben), nicht sedimentieren oder flotieren. Die
Messungen wurden durchgeführt mit Proben in geeigneter Verdünnung, unter
30 einer konstanten Temperatur von 25°C sowie einer definierten Viskosität der
Lösung. Es erfolgte eine Kalibrierung des Messgerätes mit
Standardlatexpartikeln unterschiedlicher Größe der Firma Malvern Instruments
Ltd.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (REM-Aufnahmen) zur Bestimmung der Teilchengröße wurde mit einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop vom Typ XL-30-SFEG der Firma FEI (Kassel, 5 Deutschland) angefertigt. Vorab wurden die Proben in einem Hochvakuum-Sputter 208 HR der Firma Cressington (Watford, England) mit einer 5 nm Gold-Palladium Schicht gesputtert.

Die Löslichkeit eines Stoffes gibt an, ob und in welchem Umfang ein Reinstoff in 10 einem Lösungsmittel gelöst werden kann. Sie bezeichnet also die Eigenschaft eines Stoffes, sich unter homogener Verteilung (als Atome, Moleküle oder Ionen) mit dem Lösungsmittel zu vermischen. Die Löslichkeit einer Verbindung wird als die Konzentration einer gesättigten Lösung bestimmt, die sich mit dem ungelösten Bodensatz im Gleichgewicht befindet in Abhängigkeit der 15 Temperatur (Raum Temperature). Eine schwer lösliche Verbindung weist eine Löslichkeit $< 0,1$ mol/l auf, eine mäßig lösliche zwischen $0,1-1$ mol/l und eine leicht lösliche Verbindung > 1 mol/l.

-36-

Die Erfindung soll nun im Folgenden in den Beispielen weiter beschrieben werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

Beispiele

5

Beispiel 1: Herstellung von PBCA mittels anionischer Polymerisation

Für die PBCA-Herstellung mittels anionischer Polymerisation von Butylcyanoacrylat (BCA) wird Sicomet 6000 verwendet. Der Polymerisationsprozess erfolgt durch langsames, permanentes Zutropfen von insgesamt 2,5% [m/v] BCA in eine 1%-ige [m/v] Triton X-100 Lösung bei pH 2,2. Der pH-Wert wird mit Hilfe einer 0,1 N-HCl-Lösung zuvor eingestellt. Die entstehende Dispersion wird unter Kühlung im Eisbad (ca. 4°C) über 4 Stunden konstant bei 450 U/min gerührt. Anschließend werden größere Agglomerate durch Filtration über einen Papier-Faltenfilter abgetrennt. Durch Zusatz von Ethanol wird das zu PBCA polymerisierte BCA ausgefällt und der davon gewonnene Filtrerrückstand mehrere Male mit gereinigtem Wasser (MilliQ-System) gewaschen. Nach der Trocknung des PBCA-Filtrerrückstandes im Trockenschrank bei 40°C über 24 h wird mittels GPC ein durchschnittliches Molekulargewicht bestimmt ($M_n \sim 2000$ Da). Es werden Polysterolstandards verwendet.

Beispiel 2: Herstellung von funktionalisierten PBCA-Nanopartikeln durch Nanopräzipitation

25

i) PBCA-P(DMAEMA) Nanopartikel

Es werden 500 µl einer 2%-igen acetonischen PBCA-Lösung [m/v] mit 100 µl einer 2%-igen acetonischen P(DMAEMA)-Lösung [m/v] unter Verschluss (um ein Abdampfen des Acetons zu verhindern) mittels eines Standard-Laborschüttlers gut durchmischt. Das dafür verwendete PBCA wird gemäß Beispiel 1 hergestellt. Zu diesem Polymergemisch werden je 100 µl der im folgenden beschriebenen Farbstofflösungen zugesetzt.

30

-37-

Farbstofflösung a: 3 mg des Indocyaningrün werden in 300 µl gereinigtem Wasser im Ultraschallbad vorgelöst und dann mit 700 µl Aceton versetzt.

Farbstofflösung b, c, d: Die Farbstoffe DODC, IDCC und Cumarin 6 werden in einer 0,02%-igen acetonischen Lösung [m/v] eingesetzt.

5

Das durchmischte Farbstoff-Polymergemisch wird mit einer 2,5 ml Eppendorfpipette aufgenommen und in 10 ml einer intensiv gerührten 1%-igen [m/v] Synperonic T707 Lösung einpipettiert. Die Nanopartikeldispersion wird für 2 h bei 600 U/min (Standard Magnetrührer) und für weitere 16 h bei 100 U/min zum vollständigen Abdampfen des Lösungsmittels gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Zentrifugation in Eppendorf-Caps. Jeweils 1 ml der Partikeldispersion und 0,5 ml einer 1%-igen [m/v] CETAC-Lösung (Cetyltrimethylammoniumchlorid-Lösung) werden nach Durchmischung für 10 min bei 14000 UpM (auf einer Sigma 2 K 15 Laborzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, die Partikel in der 1%-igen CETAC-Lösung redispergiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschprozess wird drei mal wiederholt, wobei zum Schluss die Partikel in einer 1%-igen Lösung Synperonic T707 aufgenommen werden.

20 ii) PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel

Es werden 500 µl einer 2%-igen acetonischen PBCA-Lösung [m/v] mit PEI 1,8 kDa in Isopropanol (2% [m/v]) verwendet. Es werden je 100 µl der unter i) genannten Farbstofflösungen a-d verwendet.

Das durchmischte Farbstoff-Polymergemisch wird mit einer 2,5 ml Eppendorfpipette aufgenommen und in 10 ml einer intensiv gerührten 1%-igen Triton X-100 Lösung einpipettiert. Die Nanopartikeldispersion wird für 2 h bei 600 U/min (Standard Magnetrührer) und für weitere 16 h bei 100 U/min zum vollständigen Abdampfen des Lösungsmittels gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Zentrifugation in Eppendorf-Caps. Jeweils 1 ml der Partikeldispersion und 0,5 ml einer 1%-igen [m/v] CETAC-Lösung (Cetyltrimethylammoniumchlorid-Lösung) werden nach Durchmischung für 10 min bei 14000 UpM (auf einer Sigma 2 K 15 Laborzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, die Partikel in der 1%-igen CETAC-Lösung redispergiert und erneut zentrifugiert.

-38-

Dieser Waschprozess wird drei mal wiederholt, wobei zum Schluss die Partikel in einer 1%-igen Lösung Triton X-100 aufgenommen werden.

iii) PLGA- P(DMAEMA)-Nanopartikel

5 Es werden 500 μ l einer 2%-igen acetonischen PLGA-Lösung [m/v] mit 100 μ l P(DMAEMA) in Aceton (2% [m/v]) verwendet. Es werden je 100 μ l der unter i) genannten Farbstofflösungen a-d verwendet.

Das durchmischte Farbstoff-Polymergemisch wird mit einer 2,5 ml Eppendorfpipette aufgenommen und in 10 ml einer intensiv gerührten 1%-igen
10 Synperonic T707 Lösung einpipettiert. Die Nanopartikeldispersion wird für 2 h bei 600 U/min (Standard Magnetrührer) und für weitere 16 h bei 100 U/min zum vollständigen Abdampfen des Lösungsmittels gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Zentrifugation in Eppendorf-Caps. Jeweils 1 ml der Partikeldispersion und
15 0,5 ml einer 1%-igen [m/v] CETAC-Lösung (Cetyltrimethylammoniumchlorid-Lösung) werden nach Durchmischung für 10 min bei 14000 UpM (auf einer Sigma 2 K 15 Laborzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, die Partikel in der 1%-igen CETAC-Lösung redispersiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschprozess wird drei mal wiederholt, wobei zum Schluss die Partikel in einer 1%-igen Lösung Synperonic T707 aufgenommen werden.

20

Beispiel 3: Beeinflussung der Nanopräzipitation durch Veränderung des Polymergehaltes in der Tensidphase

25 In Fig. 1 ist dargestellt, dass die Partikelgröße der PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel während der Herstellung durch Variation der Polymerkonzentration gesteuert werden kann. Die Stabilisierung der PBCA-P(DMAEMA) Nanopartikel, welche gemäß Beispiel 2 hergestellt werden, erfolgt mit dem Tensid Synperonic T707. Während der Partikelherstellung (Nanopräzipitation) wird das in die
30 Tensidphase injizierte Volumen der organischen Polymerlösung konstant gehalten und nur die Polymerkonzentration entsprechend verändert. Alle weiteren Herstellungsbedingungen (Tensidkonzentration, Polymerverhältnis

-39-

PBCA:P(DMAEMA)=10:1, Farbstoffkonzentration, Temperatur, Rührgeschwindigkeit / Rührfisch, Gefäß, Art der Injektion) bleiben konstant.

Die Verwendung einer geringeren Polymerkonzentration in der Tensidphase während der Fällung führt zu kleineren Partikeldurchmessern. Über den
5 untersuchten Zeitraum wurde keine Veränderung der Partikelgröße bei gleichem Polymergehalt festgestellt.

Beispiel 4: Kationisch funktionalisierte Partikel

10

Die kationisch funktionalisierten Partikel werden gemäß Beispiel 2 hergestellt.

In Fig. 2 sind die Partikeldurchmesser als auch das Zetapotential von PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikeln dargestellt, welche entweder durch das Tensid Triton X-100 oder Pluronic F 68 stabilisiert werden. Aufgrund der Verkapselung
15 des Polykations Polyethylenimin in die PBCA-Matrix weisen die Partikel ein positives Zetapotential zwischen 30 mV und 40 mV auf. Sowohl die Partikelgröße als auch das Zetapotential sind vor und nach Aufarbeitung der Partikel (Waschprozeß) konstant, Beleg für eine gute Stabilität der Partikel.

20

Beispiel 5: Elektrostatische Oberflächenmodifikation von PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel mit Glu(10)-b-PEG(110)

Die hier verwendeten PBCA-[PEI-IDCC] Nanopartikel werden gemäß Beispiel 2
25 hergestellt.

Zur Modifikation der Partikeloberfläche wird die wässrige, stabile Nanopartikeldispersion in einem geeigneten Mengenverhältnis mit dem in Wasser gelösten modifizierenden Agens vermischt. Die Bestimmung des geeigneten Mengenverhältnisses erfolgt durch schrittweise Titration der
30 Partikeldispersion mit dem modifizierenden Agens. Das Ausmaß der elektrostatischen Oberflächenmodifikation (Ladungstitration) wird durch Bestimmung des Zetapotentials kontrolliert.

-40-

Dargestellt ist in Fig. 3 die Veränderung des Zetapotentials von +25 mV auf ca. -30 mV durch schrittweise Zugabe des modifizierenden Agens (Glu(10)-b-PEG(110)) zur Partikeldispersion (Ladungstitration).

5

Beispiel 6: REM-Aufnahmen von PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln beladen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

Die mit den Farbstoffen Diethyloxadicarbocyanin (DODC) sowie Cumarin 6 beladenen PBCA-P(DMAEMA) werden gemäß Beispiel 2 hergestellt.

In Fig. 4 ist eine REM-Aufnahme von DODC-beladenen PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln dargestellt.

In Fig. 5 ist eine REM-Aufnahme von Cumarin 6 beladenen PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln dargestellt.

15

Beispiel 7: Zellkulturversuche

Die Kultivierung der HeLa-Zelllinie erfolgt in 225 cm² Kulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fötalem Kälbermedium (FCS) und 2 mM L-Glutamin. Auf antibiotische Zusätze (Penicillin / Streptomycin) wird verzichtet, um die Zellprozesse möglichst wenig zu beeinflussen. Die Zellen werden regelmäßig passagiert und eine Aussaat zu Versuchszwecken erfolgt 24 h vor Beginn der Untersuchungen.

Für die Untersuchungen werden die Zellen in 96-Wellplatten der Firma Falcon/Becton Dickinson ausgesät.

Vor Versuchsbeginn erfolgt eine optische Kontrolle bezüglich der Vitalität bzw. typischen Morphologie der Zellen. Anschließend wird das FCS-haltige Medium abgesaugt und durch 50 µl serumfreies Medium ersetzt.

Nach einer maximal 60-minütigen Inkubationszeit einer Nanopartikeldispersion, welche gemäß Beispiel 2 hergestellt wird, wird die überstehende

-41-

Partikeldispersion abgesaugt und die Zellen mit PBS 2-3 mal gewaschen. Zum Anfärben der Mitochondrien wird der zuvor in Medium verdünnte Farbstoff MitoTracker Red CMXRos der Firma Molecular Probes Europe BV, Leiden (NL) (0,25µl/ml) verwendet. Die Inkubation mit 50 µl der Farbstofflösung erfolgt für 15 min im Brutschrank (37°C, 5% CO₂). Anschließend wird die Farbstofflösung abgesaugt und die Zellen 2-3 mal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgt mit 100 µl 1,37% Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Absaugen der Fixierlösung werden die Zellen 2-3 mal mit PBS gewaschen. Die Zellkernfärbung erfolgt bei den bereits fixierten Zellen mit Höchst 33342. Dafür werden 100 µl der in PBS verdünnten Farbstofflösung (2 µg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Farbstofflösung werden die Zellen mit 100 µl PBS 2-3mal gewaschen. Die fixierten Platten werden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit 200 µl PBS/Well lichtgeschützt im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt.

15

Beispiel 8: Einfluss funktionalisierter Partikeloberflächen auf die Zellaufnahme

20 Tab. 1: Partikeldurchmesser d_{hyd} , Polydispersitätsindex und Zetapotential (nicht)-funktionalisierter Cumarin 6 beladener PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel (NP)

	Größe d_{hyd} [nm]	Polydispersitäts- index [PI]	Zetapotential [mV]
1.) Unmodifizierte NP	191	0,13	+ 31,5 ± 1,5
2.) NP mit Folsäure	195	0,06	+ 8,1 ± 3,7
3.) NP mit Glu-PEG	208	0,08	- 28,4 ± 1,2

25 Die in Beispiel 8 verwendeten Nanopartikel werden gemäß Beispiel 2 hergestellt. Unmodifiziert bzw. nach elektrostatischer Oberflächenmodifikation mit Folsäure oder Glu(10)-b-PEG(110) weisen die Partikel die in der Tabelle 1 gelisteten Eigenschaften auf.

-42-

In der für den Versuch verwendeten 96-Wellplatte haben alle Wells die gleiche Zelldichte (Aussaat 24 h vor Versuch: 1×10^4 Zellen). Inkubiert wird eine konstante Partikelkonzentration der in der Tabelle (Tab. 1) aufgeführten Partikel über einen Zeitraum von 60 Minuten im Brutschrank. Anschließend werden die
5 Zellen gewaschen, fixiert und am Folgetag vermessen. Die Aufnahme der fluoreszierenden Zellen erfolgt mit einem automatischen Fluoreszenzmikroskop bei 20-facher Vergrößerung und konstanter Belichtungszeit (siehe Fig. 6).

Anhand von Fig. 6 wird gezeigt, wie durch unterschiedliche Oberflächeneigenschaften von ein-und derselben Nanopartikelcharge das
10 Zellaufnahmeverhalten beeinflusst wird. Unmodifizierte Partikel in Reihe 1.) mit einem kationischem Oberflächenpotential zeigen eine höhere Affinität zur Zelloberfläche, erkennbar am stärkeren Fluoreszenzkontrast auf bzw. in den Zellen. Die ebenso effektive Internalisierung von Partikeln mit negativem Oberflächenpotential nach Titration mit Glu(10)-b-PEG(110) kann anhand des
15 vergrößerten Ausschnittes der Zellen aus Reihe 3.) gezeigt werden.

Beispiel 9: Zellaufnahmeverhalten Glu(10)-b-PEG(110) modifizierter PBCA P(DMAEMA)-Nanopartikel

20

Die in Beispiel 9 verwendeten Nanopartikel werden gemäß Beispiel 2 hergestellt. Nach elektrostatischer Oberflächenmodifikation mit Glu(10)-b-PEG(110) wird das Zellaufnahmeverhalten der Partikel ($d_{\text{hyd}} = 171 \text{ nm}$; $ZP = -33 \text{ mV}$) untersucht.

25 Die hell fluoreszierenden Punkte, bei welchen es sich um Endosomen oder Endolysosomen handelt, sind Beleg für eine effiziente Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle mittels Endozytose (Fig. 7). Der Maßstab der Vergrößerung belegt, dass in dieser Aufnahme einzelne Partikel aufgrund ihrer Größe von weniger als 200 nm nicht sichtbar sein können. Eine Vielzahl von
30 Partikeln innerhalb dieser Vesikel (Endosomen/Endolysosomen) verursachen den starken, punktförmigen Fluoreszenzkontrast im Cytoplasma. Die Zellaufnahme von PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln oberflächenmodifiziert mit Glu(10)-b-PEG(110) wird in Fig. 8 schematisch dargestellt.

Beispiel 10: Anreicherung der Glu(10)-b-PEG(110) modifizierten PBCA P(DMAEMA)-Nanopartikel im Zellkern

5

Anhand der Aufnahme der mittleren Zellebene mit Hilfe des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (Fig. 9) kann gezeigt werden, dass eine partielle Anreicherung der Partikel im Zellkern stattfindet.

10

Beispiel 11: Gesteigerte Partikelaufnahme bei Inkubation höherer Partikelkonzentration

Cumarin 6 beladene, Glu(10)-b-PEG(110) oberflächenmodifizierte PBCA-P(DMAEMA)-Partikel werden gemäß Beispiel 2 hergestellt. Es wird eine niedrige Partikelkonzentration 0,21 mg/ml (Fig. 10) und eine höhere Partikelkonzentration von 0,85 mg/ml (Fig. 11) für den gleichen Zeitraum inkubiert auf den Zellen gemäß Beispiel 7 inkubiert. Fig. 11 zeigt im Verhältnis zu Fig. 10 eine gesteigerte Partikelaufnahme bei Inkubation einer höheren Partikelkonzentration.

20

Beispiel 12: Charakterisierung der PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel

Dargestellt ist die Partikelgröße (Fig. 13) der für den Tierversuch verwendeten oberflächenmodifizierten PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel über einen Zeitraum von 7 Tagen nach Herstellung für den Tierversuch. Die konstante Partikelgröße sowie der gleich bleibend niedrige Polydispersitätsindex ($PI < 0,1$) als Merkmal für eine sehr enge Partikelgrößenverteilung sind Beweis für eine gute Stabilität der oberflächenmodifizierten Partikel.

30

Anhand der REM-Aufnahme (Fig. 12) kann zusätzlich belegt werden, dass es sich um sphärische Nanopartikel mit einer Größe um 200 nm handelt.

-44-

Mittels Ladungstitration wird die kationische Oberfläche der PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel mit dem Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110) modifiziert (siehe Fig. 14). Die als Zetapotential gemessene Oberflächenladung wird entsprechend von ca. +30mV über den Neutralpunkt hinaus bis zum Erreichen
5 des Dissoziations-Gleichgewichtes bei etwa -30mV titriert. Die oberflächenmodifizierten PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Partikel zeigen über den untersuchten Zeitraum von 7 Tagen nach Titration keine Veränderung des Zetapotentials. Im Zusammenhang mit der unveränderten Partikelgröße sowie dem konstant niedrigen PI kann somit eine gute Partikelstabilität belegt werden.

10

In Fig. 15 sind die UV-Vis-Absorptionsspektren einer wässrigen ICG-Lösung als auch der ICG-Nanopartikeldispersion (gewaschen und ungewaschen) dargestellt. Indocyaningrün ist ein Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff, dessen Absorptions- und Emissionsspektrum im Wellenlängenbereich zwischen 650-
15 900 nm liegt. Die Komplexierung und Einkapselung von ICG mit Hilfe des kationischen Polyacrylates P(DMAEMA) führt zu einer minimalen bathochromen Verschiebung der beiden Wellenlängenmaxima.

20 **Beispiel 13: Tierversuch**

Die eingesetzten Tiere werden von der Firma Taconic M&B geliefert. Es handelt sich um weibliche Albino-Nacktmäuse vom Typ NMRI nude. Die ausgewachsenen Tiere besitzen nach ca. 8 Wochen ein Gewicht von 22-24 g.
25 Fünf weiblichen Nacktmäusen werden 2×10^6 Zellen eines F9-Teratoms in die rechte hintere Flanke inokuliert. Die Zellen werden von der Firma ATCC / LGC Promochem GmbH bezogen. Es handelt sich um von der Maus stammende embryonale Zellen eines testinalen Teratokarzinoms, welches als Tumormodell für Krebsforschungszwecke in Mäusen verwendet wird. Nach 18 Tagen sind bei
30 vier der fünf Mäuse Tumore mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 0,5-1 cm Durchmesser gewachsen. Die Tiere werden für die erste Stunde des Versuches dauerhaft mit einer Rompun-Ketavet-Injektion in einer Dosis 100 μ l / 10 g Tier anästhesiert. Die Injektionslösung besteht aus einem 1:1 Gemisch einer 1:10

-45-

Verdünnung Rompun bzw. 1:5 Verdünnung Ketavet mit physiologischer Kochsalzlösung. Anschließend werden 200 µl der Nanopartikeldispersion in die Schwanzvene i.v. injiziert. Die nachfolgenden Narkosen erfolgen mit Rompun-Ketavet über die Lunge als Inhalationsnarkotikum, um den Kreislauf der Tiere
 5 nur minimal zu belasten. In einem Zeitraster von 24 und 48 h nach Substanzinjektion werden die Tiere fluoreszenzoptisch untersucht.

Mit Hilfe von Fig. 17 wird gezeigt, dass Glu(10)-b-PEG(110)-modifizierte PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel nach intravenöser Applikation (Schwanzvene)
 10 in der Lage sind, sich über passive Anreicherungsmechanismen (EPR-Effekt) im Tumorgewebe anzureichern. Die Untersuchung der Tumoren ex vivo belegt eine deutliche Verstärkung des Fluoreszenzkontrastes bei behandelten im Vergleich zu unbehandeltem Tumorgewebe (Vergleich Fig. 18 b mit a bzw. c mit a). Eine mehrfache, zeitversetzte Detektion der Fluoreszenz bei ein und
 15 demselben Tier ist nach 24 h und 48 h möglich (Fig. 17). Die Partikel können demzufolge in vivo ausreichend lange zirkulieren und sich entsprechend im Tumor anreichern. Die elektrostatisch pegylierte Oberfläche ist somit stabil mit der Partikeloberfläche verbunden. Es findet eine schnelle biliäre Eliminierung nicht-tumorassoziierter Partikel aus der Leber statt. Indiz dafür ist ein fehlender
 20 NIR-Fluoreszenzkontrast in der Leber nach 24 bzw. 48 h. Eine schnelle Eliminierung nicht im Tumor angereicherter Partikel aus dem Organismus (z.B. Leber) ermöglicht einen guten Tumorkontrast bei minimaler Belastung anderer Organe, Voraussetzung für ein nebenwirkungsarmes Kontrastmittelsystem.

25 Das für den Tierversuch verwendete Gerät wurde von der Firma LMTB (Berlin, Deutschland) aufgebaut. Als Einzelkomponenten wurden verwendet:

30 Laser:	Diodenlaser (742 nm), Modell Ceralas PDT 742/1,5W; Fa. CeramOptec (Bonn, Deutschland)
Anregungsfilter:	1xLCLS-750 nm-F; 1x740 nm Interferenzfilter (Bandpass)
Emissionsfilter:	1x bk-802,5-22-C1; 1xbk-801-15-C1
Kamera:	Peltier gegen Luft gekühlte CCD Kamera, Modell C4742-95 12ER, Fa. Hamamatsu (Herrsching, Deutschland)

Software: Simple PCI 5.0, Fa. Compix / Hamamatsu

Figuren

- Fig. 1: Steuerung des Partikeldurchmessers durch Änderung der Polymerkonzentration;
5 In Fig. 1 ist dargestellt, dass die Partikelgröße der PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel während der Herstellung durch Variation der Polymerkonzentration gesteuert werden kann.
- Fig. 2: Partikeldurchmesser d_{hyd} und Zetapotential von PBCA-[PEI-IDCC]-NP in gewaschener und ungewaschener Partikel in zwei verschiedenen Tensiden (TX-100 = Triton X-100, F 68 = Pluronic F-68);
10 In dieser Darstellung sind die Partikeldurchmesser als auch das Zetapotential von PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikeln dargestellt, welche entweder durch das Tensid Triton X-100 oder Pluronic F 68 stabilisiert wurden.
15
- Fig. 3: Zetapotential Glu(10)-b-PEG(110) modifizierter PBCA-[PEI-IDCC]-Nanopartikel;
20 Dargestellt ist in dieser Abbildung die Veränderung des Zetapotentials von +25 mV auf ca. -30 mV durch schrittweise Zugabe des modifizierenden Agens (Glu(10)-b-PEG(110)) zur Partikeldispersion (Ladungstitration).
- 25 Fig. 4: REM (Rasterelektronenmikroskop)-Aufnahme DODC-beladener PBCA-P(DMAEMA)- Nanopartikel;
In der Abbildung ist eine REM-Aufnahme von DODC-beladenen PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln dargestellt.
- 30 Fig. 5: REM-Aufnahme Cumarin 6-beladener PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel;
In der Abbildung ist dargestellt eine REM-Aufnahme von Cumarin 6-beladenen PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln.

- Fig. 6: Einfluss funktionalisierter Partikeloberflächen auf die Zellaufnahme:
a) Vergleich des Zellaufnahmeverhaltens nach Oberflächenmodifikation; Reihe 1: unmodifizierte Partikel; Reihe 2: NP mit Folsäure; Reihe 3: NP mit Glu(10)-b-PEG(110);
b) Ausschnitt: Reihe 3/ Well 1/ Site 15; Pfeile markieren deutliche Fluoreszenzverstärkung im Zellkern.
- Fig. 7: Nanopartikelaufnahme in HeLa-Zellen; Fluoreszenz der Nanopartikel als Graustufenabbildung;
Die Abbildung zeigt das Zellaufnahmeverhalten Glu(10)-b-PEG(110) modifizierter PBCA P(DMAEMA)-Nanopartikel in HeLa-Zellen.
- Fig. 8: Schematische Darstellung der Zellaufnahme von PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikeln oberflächenmodifiziert mit Glu(10)-b-PEG(110);
Verwendete Abkürzungen = PEG-NP: pegylierte cumarinhaltige PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel; NP: cumarinbeladene PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel; CP: Clathrin-coated pits; ES: Endosomen; LS: Lysosomen; ELS: Endolysosomen; ZK: Zellkern; H+: H⁺ATPase; PEG-Glu: freies Glu(10)-b-PEG(110) Blockcopolymer; Größenrelationen entsprechen nicht der Realität.
- Fig. 9: a) Darstellung der Fluoreszenz in der mittleren Zellebene (CLSM, konfokales Laser-Raster-Mikroskop), b) computerbasierte 3D-Darstellung der Fluoreszenz;
Die Darstellung zeigt die Anreicherung der Glu(10)-b-PEG(110) modifizierten PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel im Zellkern. Dies ist möglich durch die Beladung mit dem fluoreszenzaktiven Farbstoff Cumarin 6.

- Fig. 10: Geringere Partikelaufnahme bei Inkubation niedrigerer Partikelkonzentration: 0,21 mg/ml; Fluoreszenz der NP als Graustufenabbildung;
- 5 Die Abbildung zeigt fluoreszierende HeLa-Zellen nachdem eine Partikelkonzentration von 0,21 mg/ml inkubiert wurde. Es wurden dafür Glu(10)-b-PEG(110) oberflächenmodifizierte PBCA-P(DMAEMA)-Partikel verwendet.
- 10 Fig. 11: Gesteigerte Partikelaufnahme bei Inkubation höherer Partikelkonzentration: 0,85 mg/ml; Fluoreszenz der NP als Graustufenabbildung;
- 15 Die Abbildung zeigt deutlich stärker fluoreszierende HeLa-Zellen nachdem eine höhere Partikelkonzentration von 0,85 mg/ml inkubiert wurde. Es wurden dafür Glu(10)-b-PEG(110) oberflächenmodifizierte PBCA-P(DMAEMA)-Partikel verwendet.
- Fig. 12: REM-Aufnahme von PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikeln
- 20 Fig. 13: Partikeldurchmesser d_{hyd} der PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel, oberflächenmodifiziert mit Glu(10)-b-PEG(110);
- 25 Dargestellt ist die Partikelgröße der für den Tierversuch verwendeten oberflächenmodifizierten PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel über einen Zeitraum von 7 Tagen nach Herstellung für den Tierversuch.
- Fig. 14: Zetapotential der untitrierten (gewaschenen / ungewaschenen) und der titrierten PBCA [P(DMAEMA) ICG] Nanopartikel;
- 30 Die Abbildung zeigt die als Zetapotential gemessene Oberflächenladung der PBCA-P(DMAEMA)-Nanopartikel modifiziert mit dem Blockcopolymer Glu(10)-b-PEG(110). Dieses wurde entsprechend von ca. +30mV über den Neutralpunkt hinaus

-50-

bis zum Erreichen des Dissoziations-Gleichgewichtes bei etwa -30mV titriert.

5 Fig. 15: UV-Vis-Absorptionsspektren: a) wässrige ICG-Lösung, b) PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-NP ungewaschen; c) PBCA-[P(DMAEMA)-ICG] Nanopartikel gewaschen;

In dieser Abbildung sind die UV-Vis-Absorptionsspektren einer wässrigen ICG-Lösung als auch der ICG-Nanopartikeldispersion (gewaschen und ungewaschen) dargestellt.

10

Fig. 16: Emissionsspektrum der PBCA-[P(DMAEMA)-ICG]-Nanopartikel und einer wässrigen ICG-Lösung;

Die Abbildung stellt die entsprechenden Emissionsspektren der wässrigen ICG-Lösung im Vergleich zur Nanopartikeldispersion dar.

15

Fig. 17: Detektion der NIR-Fluoreszenz in vivo;

Die Darstellungen zeigen die NIR-Fluoreszenz in einem Zeitraster von 24 und 48 h nach Substanzinjektion (a) 24 h ventral, b) 24 h lateral, c) 48 h lateral, d) Leerwert ventral).

20

Fig. 18: NIR-Fluoreszenzkontrast des Tumorgewebes ex vivo 48 h nach Behandlung;

Die Abbildung zeigt NIR-Fluoreszenzkontraste a) eines unbehandelten Tumors ohne NIR-Fluoreszenzkontrast, b) eines großen, behandelten Tumors und c) eines mittleren, behandelten Tumors ex vivo 48 h nach Behandlung.

25
30

Patentansprüche

- 1) Polymernanopartikel mit einem kationischen Oberflächenpotential, enthaltend ein kationisches Polymer und ein in Wasser schwer lösliches Polymer, dadurch gekennzeichnet, dass diese Polymernanopartikel diagnostische und/oder therapeutische Agenzien enthalten.
- 2) Polymernanopartikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Fällungsaggregat handelt.
- 3) Polymernanopartikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das in Wasser schwer lösliche Polymer ein Polycyanoacrylate, Polyalkylcyanoacrylate (PACA), Polyester Alginsäure, Hyaluronsäure, Polysialinsäure, saure Cellulose-Derivate, saure Stärke-Derivate, Polysaccharide, polymere Proteine, Polyamide, Polyanhydride, Polyorthoester, Polycaprolactone, Polyphosphorsäure, Poly(amideenamines), Azopolymers, Polyurethane, Polyorthoester, Dendrimere, Pseudopolymaminsäuren oder sämtliche Mischungen und Co-Polymere derselben Verbindungen ist.
- 4) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 -3, dadurch gekennzeichnet, dass das in Wasser schwer lösliche Polymer ein Polybutylcyanoacrylat (PBCA) ist.
- 5) Polymernanopartikel, gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, enthaltend ein kationisch modifiziertes Polyacrylat P(DMAEMA), Diethylaminoethylmodifizierte Dextrane, Hydroxymethylcellulose-trimethylamin, Polylysin, Protaminsulfat, Hydroxyethylcellulose-trimethylamin, Polyallylaminen, Protaminchlorid, Polyallylaminhydrosalze, Polyamine, Polyvinylbenzyltrimethylammoniumsalze, Polydiallyldimethylammoniumsalze, Polyimidazolin, Polyvinylamin und Polyvinylpyridin, Polyethylenimin (PEI), Putrescin (Butan-1,4-diamin), Spermidin (N-(3-Aminopropyl)butan-1,4-diamin), Spermin (N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin) Dimethylaminoethylacrylat, Poly-N,N-dimethylaminoethylmethacrylat Dimethylaminopropylacrylamid, Dimethylaminopropylmethacrylamid, Dimethylaminostyrol, Vinylpyridin

-52-

und Methylallylamin, Poly-DADMAC, Guar, oder deacetyliertes Chitin und die entsprechenden Salze, welche sich mit geeigneten anorganischen oder niedermolekularen organischen Säuren bilden können.

- 5 6) Polymernanopartikel, gemäß Anspruch 5, enthaltend ein kationisch modifiziertes Polyacrylat P(DMAEMA),
- 7) Polymernanopartikel, gemäß Anspruch 5, enthaltend ein Polyethylenimin.
- 8) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche elektrostatisch modifiziert ist.
- 10 9) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche mit Glu(10)-b-PEG(110) modifiziert ist.
- 10) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-9 dadurch gekennzeichnet, dass das diagnostische und/oder therapeutische Agens negativ geladen ist und als Ionenpaar mit dem kationischen Polymer in
15 den Partikel eingeschlossen wird.
- 11) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem diagnostischen Agens um einen fluoreszierenden Farbstoff handelt.
- 20 12) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem diagnostischen Agens um einen fluoreszierenden NIR-Farbstoff handelt.
- 13) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem diagnostischen Agens um einen
25 Carbocyanin-Farbstoff handelt.
- 14) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem diagnostischen Agens um TSC (Tetrasulfocyanin) handelt.
- 15) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-13, dadurch
30 gekennzeichnet, dass es sich bei dem diagnostischen Agens um IDCC (Indodicarbocyanin) handelt.

-53-

- 16) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-13 dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem diagnostischen Agens um ICG (Indocyaningrün) handelt.
- 17) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem therapeutischen Agens um eine Substanz zur Therapie von Tumorerkrankungen oder Erkrankungen mit Entzündungsreaktionen handelt.
- 18) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10 und 17, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Zielstruktur gibt.
- 19) Polymernanopartikel gemäß Anspruch 18, wobei die Zielstruktur ein negativ geladenes Molekülteil besitzt und durch elektrostatische Wechselwirkungen auf die kationische Partikeloberfläche aufgebracht wird.
- 20) Polymernanopartikel gemäß Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Zielstruktur einen Antikörper, ein Protein, ein Polypeptid, ein Polysaccharid, ein DNA Molekül, ein RNA Molekül, eine chemische Einheit, eine Nukleinsäure, ein Lipid, ein Carbohydrat oder Kombinationen aus den vorgenannten beinhalten kann.
- 21) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Teilchen zwischen 1-800 nm beträgt.
- 22) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Teilchen zwischen 5-800 nm beträgt.
- 23) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Teilchen zwischen 1-500 nm beträgt.
- 24) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Teilchen zwischen 5-500 nm beträgt.
- 25) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Teilchen zwischen 1-300 nm beträgt.

-54-

- 26) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Teilchen zwischen 5-300 nm beträgt.
- 27) Polymernanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Teilchen zwischen 10-300 nm beträgt.
- 28) Die Verwendung eines Polymernanopartikels gemäß einem der Ansprüche 1-26 für die Diagnose oder Therapie von Krankheiten, Tumorerkrankungen oder Erkrankungen mit Entzündungsreaktionen.
- 29) Verfahren zur Herstellung eines Polymernanopartikels gemäß einem der Ansprüche 1-27, dadurch gekennzeichnet, dass folgende Verfahrensschritte durchgeführt werden:
- Lösen des kationischen Polymers in einem organischen Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch mit Wasser
 - Lösen des wasserunlöslichen Polymers in einem organischen Lösungsmittel
 - Lösen des Wirkstoffes (Diagnostikum oder Therapeutikum) in einem organischen Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch mit Wasser,
 - Herstellen eines vollständig gelösten Gemisches aus kationischem Polymer, wasserunlöslichem Polymer und Wirkstoff
 - Einbringen des Gemisches in eine tensidhaltige Lösung, wobei es zur spontanen Bildung von Fällungsaggregaten kommt.
 - Entfernen des Lösungsmittels.
 - Elektrostatische Oberflächenmodifikation der Partikel durch Zusammenfügen von Nanopartikeldispersion und modifizierendem Agens in geeigneten Mengen (Fakultativ)..
- 30) Verwendung eines Nanopartikels gemäß einem der Ansprüche 1-27 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung /Arzneiform unter Verwendung pharmazeutisch akzeptabler Hilfsstoffe.
- 31) Verwendung eines Nanopartikels gemäß einem der Ansprüche 1-27, wobei die pharmazeutische Zubereitung über ein geeignetes

-55-

Applikationssystem an Mensch oder Tier über einen geeigneten Applikationsweg verabreicht wird.