

EUROPÄISCHE EIGNUNGSPRÜFUNG 2016

Aufgabe A(Ch)

Chemie

Diese Prüfungsaufgabe enthält:

- | | | |
|---|-------------------------|---------------------|
| * | Schreiben des Anmelders | 2016/A(Ch)/DE/1-11 |
| * | Dokument D1 | 2016/A(Ch)/DE/12-13 |
| * | Dokument D2 | 2016/A(Ch)/DE/14-16 |



Schreiben des Anmelders

Nano BioTech&No.Logic
Burjassot Campus

Oficina de D. Arturo Barea. Patentes
Alcalá 42
Madrid

Sehr geehrter Herr Barea,

[001] wir sind ein kleines universitäres Spin-off-Unternehmen im Bereich der Biopharmazeutika. Wir arbeiten an Strategien zur Verabreichung von Insulin auf oralem Weg zur Behandlung von Diabetes. Auf unserer Forschung basierende neue und vielversprechende biologisch abbaubare Nanopartikel sind jetzt bereit für klinische Tests. Wir bitten Sie, in unserem Namen eine europäische Patentanmeldung einzureichen, die alle Aspekte unserer Technologie abdeckt.

[002] Da wir momentan versuchen, Geldgeber für die Entwicklung unserer Nanopartikel zu finden, bitten wir Sie, die Anmeldung so zu formulieren, dass das EPA sofort ein Patent darauf erteilen kann. Bitte beachten Sie, dass wir aus finanziellen Gründen die Zahlung von Anspruchsgebühren vermeiden möchten.

[003] Mit diesem Schreiben übersenden wir Ihnen alle erforderlichen Informationen für die Erstellung der Patentanmeldung. Bei der Abfassung der Anmeldung werden Sie vermutlich das angefügte Dokument D1 berücksichtigen müssen. Außerdem legen wir einen kurzen Artikel (D2) aus dem *Journal of Controlled Release* bei, den wir vor einem Jahr veröffentlicht haben und der Ihnen einen besseren Einblick in das Gebiet der Erfindung bieten wird.



[004] Die überwiegende Mehrheit der Peptidbiopharmazeutika wird durch intravenöse oder subkutane Injektion verabreicht. Diese Verabreichungsarten sind oft unangenehm und schmerzhaft, insbesondere wenn täglich mehrere Injektionen erforderlich sind.

[005] Eine orale Verabreichung von Peptidbiopharmazeutika würde diese Nachteile überwinden.

[006] Der Begriff „Peptidbiopharmazeutikum“ bezieht sich auf therapeutisch aktive Peptide, die 70 oder weniger Aminosäuren umfassen.

[007] Der Begriff „orale Verabreichung“ bezieht sich auf die Verabreichung durch Schlucken. Die Absorption der therapeutisch aktiven Peptide in den Blutkreislauf erfolgt in der Regel durch die Darmschleimhaut.

[008] Die orale Verabreichung von Peptidbiopharmazeutika ist eine Herausforderung, denn die therapeutisch aktiven Peptide werden in der sauren Umgebung des Magens abgebaut und/oder destabilisiert. Ein weiteres Hindernis ist die Permeabilität der Darmschleimhaut für Peptide, die den Umfang der intestinalen Absorption und die Effizienz der therapeutischen Wirkung bestimmt.

[009] Ausgeklügelte Strategien sind daher erforderlich, um die therapeutisch aktiven Peptide im Magen zu schützen und die intestinale Absorption zu verbessern.

[010] Ein allgemein bekannter Ansatz hierfür ist die Verkapselung in Polymernanopartikel. Diese Strategie könnte jedoch für die orale Verabreichung von therapeutisch aktiven Peptiden ungeeignet sein, weil eine Verkapselung einer akzeptablen Wirkstoffmenge schwierig ist.

[011] Der Begriff „Wirkstoffmenge“ bezieht sich auf die Menge therapeutisch aktiven Peptids, die in dem Polymernanopartikel verkapselt oder eingeschlossen ist.



[012] Unser Ziel war es, eine Technologie für die effiziente orale Verabreichung von Peptidbiopharmazeutika, insbesondere von metabolischen Peptiden zu entwickeln, die derzeit Injektionen erfordert.

[013] Der Begriff „metabolisches Peptid“ bezieht sich auf ein den Stoffwechsel regulierendes Hormon, wie Amylin, Calcitonin, Glucagon, Insulin oder Secretin. Wir haben uns insbesondere auf Insulin konzentriert. Der Begriff „Insulin“ bezieht sich auf Insulin oder ein synthetisches Insulinanalogon.

[014] Unsere Technologie umfasst: 1) biologisch abbaubare Nanopartikel auf der Basis von Polyalkylcyanoacrylat (PACA) umfassend ein darin verkapseltes oder eingeschlossenes metabolisches Peptid, 2) Verfahren zur Herstellung der PACA-Nanopartikel und 3) PACA-Nanopartikel umfassende pharmazeutische Dosierungsformen zur oralen Verabreichung.

[015] Der Begriff „Polyalkylcyanoacrylat (PACA)“, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf biologisch abbaubare Homopolymere von C₂-C₁₂-Alkyl-2-Cyanoacrylatmonomeren, insbesondere auf biologisch abbaubare Homopolymere von C₂-C₈-Alkyl-2-Cyanoacrylatmonomeren, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Ethyl-2-Cyanoacrylat, n-Butyl-2-Cyanoacrylat, Isobutyl-2-Cyanoacrylat, n-Hexyl-2-Cyanoacrylat, Isohexyl-2-Cyanoacrylat und 2-Octyl-2-Cyanoacrylat.

[016] Die hier beschriebenen biologisch abbaubaren PACA-Nanopartikel haben einen mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen, hydrodynamischen Durchmesser zwischen 10 nm und 500 nm. Nanopartikel, die zur intestinalen Absorption geeignet sind, müssen einen hydrodynamischen Durchmesser von 300 nm oder weniger haben. Vorzugsweise wird eine Population von biologisch abbaubaren PACA-Nanopartikeln bereitgestellt, bei der mindestens 90% der Nanopartikel einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 100 nm und 300 nm haben.



[017] Bei oraler Verabreichung wird die Integrität der biologisch abbaubaren PACA-Nanopartikel während der Passage durch den Magen bewahrt, bis sie den Dünndarm erreichen. Im Dünndarm werden die PACA-Nanopartikel absorbiert, das biologisch abbaubare Polymer zerfällt langsam und setzt das therapeutisch aktive Peptid kontrolliert frei.

[018] Die Geschwindigkeit, mit der das Polymer zerfällt und das therapeutisch aktive Peptid freigesetzt wird, hängt primär von der Alkylkettenlänge der Alkyl-2-Cyanoacrylatmonomere ab. Die Polymere kurzkettiger Alkyl-2-Cyanoacrylatmonomere, wie das C₆-Alkyl oder kürzere, haben geeignete Zerfallsgeschwindigkeiten und werden vorteilhafterweise verwendet. In dieser Hinsicht bevorzugte Alkyl-2-Cyanoacrylate sind Ethyl-2-Cyanoacrylat und n-Butyl-2-Cyanoacrylat.

[019] Gemäß unserer Technologie wird während des Polymerisationsprozesses ein therapeutisch aktives Peptid, insbesondere ein metabolisches Peptid wie Insulin, in den biologisch abbaubaren PACA-Nanopartikeln verkapselt oder eingeschlossen, d. h. das Peptid wird im Polymerisationsmedium gelöst oder dispergiert und anschließend wird die Polymerisationsreaktion durchgeführt.

[020] Hierfür eignet sich jedes aus dem Stand der Technik bekannte Polymerisationsverfahren, wie z. B. die Grenzflächenpolymerisation oder die anionische Polymerisation.

[021] Vorzugsweise werden die biologisch abbaubaren PACA-Nanopartikel durch eine anionische Polymerisation hergestellt, die folgende Schritte umfasst:

- a) Lösen einer therapeutisch wirksamen Menge eines Peptids in einer sauren wässrigen Lösung;
- b) Mischen der wässrigen Lösung mit einem Öl und einem nichtionischen Tensid und Rühren zur Bildung einer Wasser-in-Öl-Nanoemulsion;
- c) Lösen eines C₂-C₁₂-Alkyl-2-Cyanoacrylatmonomers in einem organischen Lösungsmittel;
- d) Langsame Zugabe der organischen Lösung des Monomers aus Schritt c) zu der Nanoemulsion aus Schritt b) unter ständigem Rühren, sodass die Polymerisation spontan ausgelöst wird;



- e) Fortschreitenlassen der Polymerisation und Verdampfenlassen des organischen Lösungsmittels, sodass PACA-Nanopartikel hergestellt werden;
- f) Abtrennung der Nanopartikel aus der Nanoemulsion und Reinigung der Nanopartikel.

[022] Das organische Lösungsmittel ist normalerweise Chloroform. Zur Erzeugung der sauren wässrigen Lösung aus Schritt a) kann jede Säure verwendet werden. Das Öl ist normalerweise Ethyloleat. Das nichtionische Tensid ist typischerweise Sorbitanmonolaurat oder Polyvinylalkohol.

[023] Das C₂-C₁₂-Alkyl-2-Cyanoacrylatmonomer und das therapeutisch aktive Peptid haben normalerweise ein Gewichtsverhältnis von 2:1.

[024] Die PACA-Nanopartikel haben eine Wirkstoffmenge von 10 bis 30 Gew.-% des therapeutisch aktiven Peptids bezogen auf das Gesamtgewicht der Nanopartikel, vorzugsweise 15 bis 30 Gew.-%. Eine Wirkstoffmenge unter 10 Gew.-% des therapeutisch aktiven Peptids bezogen auf das Gesamtgewicht der Nanopartikel resultiert in einer schlechten Verkapselungseffizienz und reicht nicht aus, um eine signifikante pharmakologische Wirkung zu erzielen.

[025] Ein pharmazeutisch akzeptabler Stabilisator wie Dextran, Chitosan, Fucoidan, Pektin, Amylase oder Amylopektin kann ebenfalls in die Nanopartikel eingefügt werden. In diesem Fall wird der Stabilisator zum therapeutisch aktiven Peptid in Schritt a) hinzugefügt, normalerweise in einer Menge von 0,5 bis 1 Gew.-% bezogen auf das Gewicht des therapeutisch aktiven Peptids.

[026] Der pH-Wert der in Schritt a) verwendeten sauren wässrigen Lösung liegt normalerweise im Bereich von 1 bis 6. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der pH-Wert der wässrigen Lösung aus Schritt a) 2 oder darunter.



[027] Wir haben dieses Verfahren erfolgreich zur Herstellung von insulinbeladenen PACA-Nanopartikeln entwickelt. In Vorabtests, die den beiliegenden Beispielen zu entnehmen sind, haben wir Ratten insulinbeladene, biologisch abbaubare PACA-Nanopartikel oral verabreicht. Wir haben beobachtet, dass die PACA-Nanopartikel therapeutisch wirksame Mengen an Insulin über einen längeren Zeitraum nach der oralen Verabreichung freisetzen. Belegt wird dies durch eine signifikante Absenkung des Blutzuckerspiegels (siehe Abb. 1).

[028] Außerdem haben wir unerwartet festgestellt, dass Insulin bei einem pH-Wert von 2 oder darunter während der Polymerisationsreaktion einen nicht kovalenten Komplex mit PACA bildet. Der Komplex ist dann in den biologisch abbaubaren PACA-Nanopartikeln eingeschlossen. Bei einem pH-Wert über 2 bildet das Insulin jedoch keinen Komplex, sondern wird als freies Insulin in die PACA-Nanopartikel eingefügt.

[029] Wir glauben, dass dies an den physikochemischen Eigenschaften des Insulins sowie an dem Mechanismus, durch den es zur anionischen Polymerisation kommt, liegt. Insulin hat einen isoelektrischen Punkt von 5,3. Bei einem pH-Wert unter 5,3 kann es positiv geladen sein. Bei einem pH-Wert von 2 oder darunter hat Insulin eine starke positive Nettoladung und kann deshalb einen nicht kovalenten Komplex mit den negativ geladenen PACA-Ketten während der Polymerisationsreaktion bilden.

[030] PACA-Nanopartikel, in denen das Insulin in Form von nicht kovalenten Komplexen eingeschlossen ist, haben den Vorteil, dass Insulin über einen längeren Zeitraum nach der oralen Verabreichung freigesetzt wird. Außerdem vermuten wir, dass Insulin in Form von nicht kovalenten Komplexen eine verbesserte intestinale Absorption aufweist. Dies führt über längere Zeiträume zu therapeutisch wirksamen Insulinkonzentrationen im Blut, was den physiologischen Insulinbedarf deckt und den Blutzuckerspiegel senken kann (siehe Abb. 1).



[031] Wir haben jedoch auch beobachtet, dass bei einem pH-Wert von 2 oder darunter die Verkapselung von Insulin während der Polymerisationsreaktion zu PACA-Nanopartikeln mit unregelmäßigen, instabilen Oberflächen mit kristallinem Material führt. Die physikalische Instabilität geht mit einer schlechten Verkapselungseffizienz und einer ungenügenden Insulinbeladung einher.

[032] Um dies zu vermeiden, ist es entscheidend, einen pharmazeutisch akzeptablen Stabilisator in PACA-Nanopartikel, die bei einem pH-Wert von 2 oder darunter hergestellt werden, einzubauen. Zu diesem Zweck wird Dextran verwendet. Dextran führt zur notwendigen Stabilisierung und zur Bildung von Nanopartikeln mit akzeptabler Morphologie. Auch Chitosan und Pektin werden mit den gleichen guten Ergebnissen zu diesem Zweck verwendet. Eine effiziente Nanopartikelstabilisierung hängt jedoch auch von der Alkylkettenlänge der Alkyl-2-Cyanoacrylatmonomere ab, die das PACA bilden.

[033] Die hier beschriebenen biologisch abbaubaren PACA-Nanopartikel können in orale Dosierungsformen eingebracht werden, z. B. in Kapseln oder Tabletten. Eine Beschichtung kann auf die oralen Dosierungsformen aufgebracht werden, um diese zusätzlich zu schützen, während sie den Magen passieren.

[034] Die biologisch abbaubaren PACA-Nanopartikel und die pharmazeutischen oralen Dosierungsformen können zur Behandlung eines breiten Spektrums von Stoffwechselerkrankungen genutzt werden, zum Beispiel von Störungen, die mit einem erhöhten Blutzuckerspiegel verbunden sind. Insulinenthaltende PACA-Nanopartikel können verwendet werden, um Diabetespatienten, insbesondere Patienten mit Typ-2-Diabetes, mit Insulin zu versorgen.

[035] Die hier beschriebene Technologie wird anhand der folgenden Beispiele genauer veranschaulicht:

Beispiel 1

[036] Insulin enthaltende biologisch abbaubare PACA-Nanopartikel wurden durch anionische Polymerisation hergestellt. Als Monomere wurden Ethyl-2-Cyanoacrylat (ECA), n-Butyl-2-Cyanoacrylat (BCA), n-Hexyl-2-Cyanoacrylat (HCA) und 2-Octyl-2-Cyanoacrylat (OCA) verwendet.



[037] 0,25 g Insulin wurden in 5 ml Wasser mit einem pH-Wert von 5 aufgelöst. Die wässrige Lösung wurde mit Ethyloleat und Sorbitanmonolaurat in einem Gewichtsverhältnis von 1:4:5 gemischt. Eine Wasser-in-Öl-Nanoemulsion wurde durch Rühren bei 700 rpm bei 4°C hergestellt. 0,5 g des Monomers wurden in 2 ml Chloroform aufgelöst und langsam unter ständigem Rühren zu der Nanoemulsion hinzugefügt. Das Gemisch wurde 3 Stunden gerührt und über Nacht stehen gelassen. Die Nanopartikel wurden durch Zentrifugation abgetrennt, mit absolutem Ethanol gewaschen und durch Filtration gereinigt. Die Oberflächenmorphologie der Nanopartikel wurde durch Scanning Electron Microscopy (SEM) kontrolliert. Die Nanopartikel waren kugelförmig, mit einer glatten Oberfläche und frei von kristallinem Material. Die Partikelgröße wurde mittels dynamischer Lichtstreuung geschätzt. 90% der Nanopartikel hatten einen hydrodynamischen Durchmesser im Bereich von 120 nm bis 280 nm. Die Insulin-Wirkstoffmenge wurde mittels aus dem Stand der Technik bekannter Verfahren bestimmt.

Tabelle 1

Zusammensetzung	Monomer	Insulin-Wirkstoffmenge (Gew.-%)
A	ECA	22,1
B	BCA	22,7
C	HCA	21,8
D	OCA	21,5

[038] Die Ergebnisse zeigen die Bildung Insulin enthaltender PACA-Nanopartikel mit hoher Insulinwirkstoffmenge, die nicht signifikant durch die Wahl des Monomers beeinflusst wurde.

Beispiel 2

[039] Insulin enthaltende Nanopartikel wurden unter Verwendung von BCA anhand des in Beispiel 1 beschriebenen Verfahrens hergestellt. Dextran 10 oder Dextran 20 (Molekulargewicht 10 000 bzw. 20 000) wurde als Stabilisator in die Nanopartikel eingebracht. Das Dextran wurde in Mengen von 0,5% oder 1% (Gew.-% bezogen auf das Insulin) zu der wässrigen Insulinlösung hinzugegeben, bevor diese mit dem Öl und dem Tensid gemischt wurde.



Tabelle 2

Zusammensetzung	Dextran	Konzentration (Gew.-%)	Insulin-Wirkstoffmenge (Gew.-%)
E	Dextran 10	0,5	22,6
F	Dextran 10	1	23,1
G	Dextran 20	0,5	23,2
H	Dextran 20	1	22,8

[040] Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Insulin-Wirkstoffmenge festgestellt, wenn entweder das Molekulargewicht oder die Konzentration von Dextran geändert wurde.

Beispiel 3

[041] Insulin enthaltende PACA-Nanopartikel wurden aus verschiedenen Monomeren anhand des in Beispiel 1 beschriebenen Verfahrens hergestellt, mit der Ausnahme, dass die wässrige Lösung des Insulins mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und wahlweise Dextran 10 als Stabilisator hinzugefügt wurde. Insulin-Wirkstoffmenge und Oberflächenmorphologie der Nanopartikel wurden analysiert.

Tabelle 3

Zusammen- setzung	Monomer	Dextran 10 (Gew.-%)	Oberflächenmorphologie (mittels SEM)	Insulin- Wirkstoffmenge (Gew.-%)
I	ECA	-	unregelmäßig, Kristalle	3,9*
J	ECA	0,5	glatt, kein kristall. Material	17,1
K	BCA	-	unregelmäßig, Kristalle	4,2*
L	BCA	0,5	glatt, kein kristall. Material	18,9
M	HCA	-	unregelmäßig, Kristalle	3,8*
N	HCA	0,5	glatt, kein kristall. Material	17,6
O	OCA	-	unregelmäßig, Kristalle	5,6*
P	OCA	0,5	unregelmäßig, Kristalle	5,4*

* Insulin-Wirkstoffmenge war wegen der Instabilität der Nanopartikel schwierig zu messen.



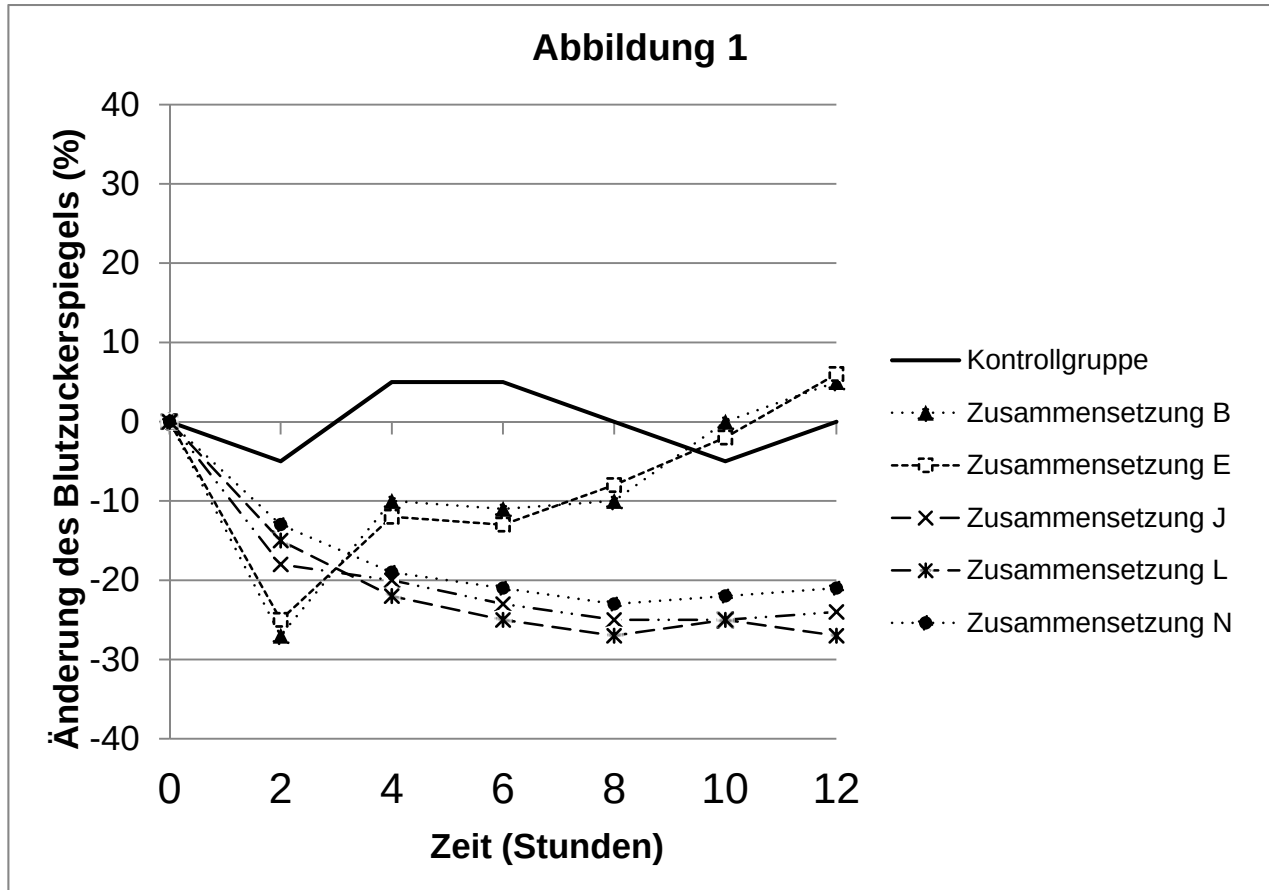
[042] Nanopartikel mit akzeptabler Stabilität, Morphologie und Insulin-Wirkstoffmenge konnten mit OCA nicht hergestellt werden, selbst wenn höhere Konzentrationen von Dextran oder anderen Stabilisatoren verwendet wurden.

Beispiel 4

[043] Eine *in vivo*-Studie wurde mit Wistar-Ratten durchgeführt. Insulin enthaltende PACA-Nanopartikel wurden in einer wässrigen Salzlösung suspendiert. Die Ratten erhielten eine einzige Dosis PACA-Nanopartikel (20 mg/kg Körpergewicht) durch orale Verabreichung. Die Kontrollgruppe erhielt nur die Salzlösung. Blutproben wurden vor der Verabreichung (Referenz) und in bestimmten Zeitabständen (2, 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden) nach der Verabreichung genommen, und der Blutzuckerspiegel wurde anhand kommerziell erhältlicher Tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 als prozentuale Änderung des Blutzuckerspiegels (%) gegenüber der Referenz angegeben. Sie zeigen, dass eine signifikante Absenkung des Blutzuckerspiegels über einen längeren Zeitraum nach der oralen Verabreichung Insulin enthaltender PACA-Nanopartikel aufrechterhalten werden kann.



Abbildung 1: Prozentuale Änderung des Blutzuckerspiegels (%) vs. Zeit (Stunden) nach oraler Verabreichung



Dokument D1

WO 91/00XXX

POLYMERNANOPARTIKEL FÜR DIE ORALE VERABREICHUNG VON INSULIN

Technisches Gebiet

[001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Polyisobutylcyanoacrylat-Nanopartikel als Arzneimittelträger für die orale Verabreichung von Insulin.

Hintergrund

[002] Seit der Entdeckung des Insulins durch Banting und Best im Jahre 1922 wurden Versuche unternommen, um den besten Weg zur Verabreichung von Insulin bei der Behandlung von Diabetes zu finden. Eine orale Verabreichung von Insulin ist wünschenswert. Dies setzt voraus, dass das Insulin vor dem Abbau im Magen geschützt ist.

[003] Polyisobutylcyanoacrylat, ursprünglich als Gewebekleber in der Chirurgie eingesetzt, kann ein geeigneter Arzneimittelträger sein. Die Geschwindigkeit des biologischen Abbaus von Polyalkylcyanoacrylate (PACA) hängt von der Länge der Alkylkette ab. Polyisobutylcyanoacrylat hat den großen Vorteil, dass es sowohl biokompatibel ist als auch eine hervorragende biologische Abbaurate hat.

Offenbarung der Erfindung

[004] Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung von Polymernanopartikeln auf der Basis von Polyisobutylcyanoacrylat, die Insulin zwecks intestinaler Absorption einschließen und transportieren können, zur Behandlung von Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes, insbesondere Typ-2-Diabetes, mittels oraler Verabreichung.



[005] Die Nanopartikel werden durch Grenzflächenpolymerisation unter Verwendung von Isobutyl-2-Cyanoacrylat hergestellt. Insulin wird einer lipophilen Phase zugesetzt, die Fettsäuretriglyceride mittlerer Kettenlänge und Isobutyl-2-Cyanoacrylat gelöst in absolutem Ethanol enthält. Die lipophile Phase wird dann einer wässrigen Lösung mit neutralem oder leicht saurem pH-Wert zugesetzt, die ein nichtionisches Tensid enthält, und die Nanopartikel werden sofort durch mechanisches Rühren gebildet. Die erzeugte kolloidale Suspension kann durch Verdampfen konzentriert und durch Filtration gereinigt werden.

[006] Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können zusätzlich darin eingeschlossen eine weitere Substanz oder einen Zusatzstoff umfassen, sind, z. B. einen pharmazeutisch akzeptablen Stabilisator wie Chitosan, Dextran oder Pektin. In diesem Fall wird der Stabilisator der lipophilen Phase zusammen mit dem Insulin zugesetzt.

[007] Der mittels dynamischer Lichtstreuung gemessene hydrodynamische Durchmesser der erfindungsgemäßen Insulin enthaltenden Nanopartikel ist so, dass 95% der Nanopartikel im Bereich von 140 nm bis 300 nm liegen.

[008] Die durchschnittliche Wirkstoffmenge der Nanopartikel liegt bei etwa 25 Gew.-% Insulin bezogen auf das Gesamtgewicht der Nanopartikel. Die erzielte hohe Insulinbeladung ist ein sehr aufregendes Ergebnis, da die Nanopartikel das Insulin im Magen schützen und eine therapeutisch wirksame Absorption im Dünndarm erlauben können.

Ansprüche

1. Biologisch abbaubare Polyisobutylcyanoacrylat-Nanopartikel umfassend darin eingeschlossenes Insulin.
2. Nanopartikel nach Anspruch 1 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes, vorzugsweise Diabetes Typ 2.



Dokument D2

Journal of Controlled Release, März 2015

PEPTID-POLYMER-INTERAKTIONEN BEI DER POLYMERISATION VON
POLYALKYLCYANOACRYLAT-NANOPARTIKELN

Nano BioTech&No.Logic, Burjassot Campus

[001] Biologisch abbaubare Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikel (PACA) können als Arzneimittelträger für die kontrollierte Freisetzung von Peptidbiopharmazeutika interessant sein. Hohe Einschlusseffizienzen lassen sich durch anionische Polymerisation von Alkyl-2-Cyanoacrylat erreichen. Dieses Polymerisationsverfahren setzt voraus, dass das bioaktive Peptid im Polymerisationsmedium vorhanden ist. Somit kann das bioaktive Peptid die Polymerisationsreaktion stören. Insbesondere kann es zur Bildung starker kovalenter Peptid-Polymer-Bindungen kommen, da verschiedene Aminosäurereste des Peptids an das Alkyl-2-Cyanoacrylat binden und den vollständigen Ablauf der Polymerisation blockieren können.

[002] Kovalente Peptid-Polymer-Bindungen können dazu führen, dass große Mengen des in den Nanopartikeln eingeschlossenen Peptids nicht freigesetzt werden. Dieser unerwünschte Effekt kann die Bioaktivität und die therapeutische Wirksamkeit der PACA-Nanopartikel beeinträchtigen. In dieser Publikation untersuchen wir das Vorkommen kovalenter Peptid-Polymer-Interaktionen während der Bildung von Polyethylcyanoacrylat- und Poly-n-butylcyanoacrylat-Nanopartikeln mit den bioaktiven Peptiden Angiotensin II, Insulin, insulinartigem Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) und Secretin.



Versuche

[003] PACA-Nanopartikel wurden durch anionische Polymerisation hergestellt. 0,1 g Peptid wurden in 2,5 ml Wasser mit einem pH-Wert von 5 gelöst. Eine Wasser-in-Öl-Nanoemulsion wurde hergestellt, indem die wässrige Phase, Ethyloleat und Polyvinylalkohol (im Gewichtsverhältnis 1:3,5:5,5) gemischt wurden. 0,2 g Ethyl-2-Cyanoacrylat (ECA) oder n-Butyl-2-Cyanoacrylat (BCA) gelöst in 1 ml Chloroform wurden der Nanoemulsion unter ständigem Rühren langsam hinzugefügt. Das Gemisch wurde zum Abschluss der Polymerisation über Nacht stehen gelassen. Nanopartikel wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der mittels dynamischer Lichtstreuung gemessene hydrodynamische Durchmesser war so, dass 90% der Nanopartikel im Bereich von 120 nm bis 280 nm lagen. Die durchschnittliche Wirkstoffmenge (Gewicht des bioaktiven Peptids bezogen auf das Gesamtgewicht der Nanopartikel) lag zwischen 21,7% und 22,5%. Kovalente Peptid-Polymer-Bindungen wurden durch Massenspektrometrie charakterisiert.

Ergebnis und Diskussion

[004] Bei drei der vier untersuchten bioaktiven Peptide wurde festgestellt, dass sie den Polymerisationsprozess stören.

Bioaktives Peptid	Kovalente Peptid-Polymer-Bindung		Stelle der kovalenten Bindungen
	ECA	BCA	
Angiotensin II	ja	ja	Histidin
Insulin	nein	nein	-
IGF-1	ja	ja	Glutaminsäure
Secretin	ja	ja	Histidin

[005] Kovalente Peptid-Polymer-Bindungen wurden für Angiotensin II, IGF-1 und Secretin identifiziert. Kovalente Bindungen entstehen durch Reaktion von Histidin und Glutaminsäure der Peptide mit ECA und BCA. Insulin hingegen störte die Polymerisationsreaktion bei einem pH-Wert von 5 nicht. Die dreidimensionale Faltung des Insulins unter den Polymerisationsbedingungen macht die reaktiven Aminosäuregruppen für eine kovalente Interaktion sterisch unzugänglich.



[006] Um den Einfluss des pH-Werts auf das Auftreten kovalenter Peptid-Polymer-Interaktionen zu untersuchen, wurde die Polymerisationsreaktion bei einem pH-Wert von 1,9 wiederholt. Die Absenkung des pH-Werts verhinderte nicht die kovalente Bindung von Angiotensin II, IGF-1 und Secretin an ECA und BCA. Bei diesen Peptiden scheint die Reaktivität der Aminosäuregruppen unabhängig vom pH-Wert zu sein.

[007] Für Insulin haben wir bei einem pH-Wert von 1,9 jedoch beobachtet, dass die Bildung ausgeprägter, gut geformter PACA-Nanopartikel sowohl mit ECA als auch mit BCA beeinträchtigt war. Wir konnten nur instabile Nanopartikel mit unregelmäßiger Form und einer inakzeptabel geringen Insulin-Wirkstoffmenge von etwa 4% isolieren.

