

PRÜFUNGSARBEIT EINES BEWERBERS

A (Ch), EEP 2016

Anspruch 1:

Biologisch abbaubare Nanopartikel auf Basis von biologisch abbaubaren Homopolymeren von C₂-C₆-Alkyl-2-Cyanoacrylat-Monomeren mit einem mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen hydrodynamischen Durchmesser von 10 bis 300 nm, enthaltend

- 10 – 30 Gew.-% Insulin, bezogen auf das Gesamtgewicht der Nanopartikel, und
- einem pharmazeutisch akzeptablen Stabilisator ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Dextran, Chitosan und Pektin,

wobei das Insulin in Form eines nicht-kovalenten Komplexes aus Insulin und dem Homopolymer in dem Nanopartikel enthalten ist.

Anspruch 2:

Nanopartikel gemäß Anspruch 1, wobei es sich um Nanopartikel auf Basis von Homopolymeren von Ethyl-2-Cyanoacrylat, n-Butyl-2-Cyanoacrylat oder n-Hexyl-2-Cyanoacrylat handelt.

Anspruch 3:

Nanopartikel gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei der Stabilisator Dextran ist.

Anspruch 4:

Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens 90 % der Nanopartikel einen hydrodynamischen Durchmesser zwischen 10 und 300 nm aufweisen, welcher mittels dynamischer Lichtstreuung gemessen wird.

Anspruch 5:

Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Stabilisator Dextran mit einem Molekulargewicht von 10.000 oder 20.000 ist.

Anspruch 6:

Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei 15-30 Gew.-% Insulin enthalten sind, bezogen auf das Gesamtgewicht der Nanopartikel.

Anspruch 7:

Verfahren zur Herstellung von biologisch abbaubaren Nanopartikeln gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 durch anionische Polymerisation, umfassend die Schritte

- a) Lösen von Insulin in einer wässrigen Lösung mit einem pH-Wert von ≤ 2 , wobei die Menge an Insulin 10 bis 30 Gew.-% bezogen auf das Gesamtgewicht der Nanopartikel beträgt;
- b) Hinzufügen eines pharmazeutisch akzeptablen Stabilisators ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Dextran, Chitosan und Pektin;
- c) Mischen der wässrigen Lösung aus Schritt b) mit einem Öl und einem nicht-ionischen Tensid und Rühren bis eine Wasser-in-Öl-Nanoemulsion erhalten wird;
- d) Lösen eines C2-C6-Alkyl-Cyanoacrylatmonomers in einem organischen Lösungsmittel;
- e) Langsame Zugabe der Lösung aus Schritt d) zu der Nanoemulsion aus Schritt c) unter ständigem Rühren, wobei die Polymerisation spontan ausgelöst wird;
- f) Fortschreiten-lassen der Polymerisation und Verdampfenlassen des organischen Lösungsmittels, um die Nanopartikel herzustellen; und
- g) Abtrennung der entstandenen Nanopartikel aus der Nanoemulsion und Reinigung der Nanopartikel.

Anspruch 8:

Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei das Gewichtsverhältnis von C2-C6-Alkyl-2-Cyanoacrylat-monomere und Insulin 2 : 1 beträgt.

Anspruch 9:

Verfahren gemäß Anspruch 7 oder 8, wobei in Schritt a) 0,5 - 1,0 Gew.-% des Stabilisators hinzugefügt wird, bezogen auf das Gewicht von Insulin.

Anspruch 10:

Pharmazeutische orale Dosierungsform enthaltend biologisch abbaubare Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.

Anspruch 11:

Dosierungsform gemäß Anspruch 10, wobei die Dosierungsform eine Kapsel oder Tablette ist.

Anspruch 12:

Dosierungsform gemäß Anspruch 10 oder 11, wobei die Dosierungsform beschichtet ist.

Anspruch 13:

Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 oder pharmazeutische Dosierungsform gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 zur medizinischen Verwendung.

Anspruch 14:

Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 oder pharmazeutische Dosierungsform gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 zur Verwendung bei einem Verfahren zur Behandlung von Diabetes, vorzugsweise Diabetes Typ II.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft biologisch abbaubare Nanopartikel enthaltend Insulin in Form eines nicht-kovalenten Insulin-Homopolymer-Komplexes. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Nanopartikel. Ferner betrifft die Erfindung pharmazeutische orale Dosierungsformen enthaltend die Nanopartikel, sowie die Verwendung der Nanopartikel bzw. der Dosierungsform zu medizinischen Zwecken, insbesondere bei der Behandlung von Diabetes.

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. Eine orale Verabreichung von Peptidbiopharmazeutika würde diese Nachteile überwinden.

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

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.

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.

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

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.

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

Polymernanopartikel zur oralen Verabreichung von Insulin sind beispielsweise aus D1 bekannt, welches das Ziel hat, Polymernanopartikel auf der Basis von Polyisobutylcyanoacrylat bereitzustellen. Diese sollen Insulin zwecks intestinaler Absorption einschließen und transportieren können. So soll Stoffwechselerkr. wie Diabetes, v. a. Typ II-Diabetes mittels oraler Verabreichung behandelt werden.

Gemäß D1 werden die Nanopartikel 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.

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.

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.

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.

Auch D2 beschreibt biologisch abbaubare Nanopartikel, welche geeignet sein können für die kontrollierte Freisetzung von Peptidbiopharmazeutika, da sie als Arzneimittelträger dienen können.

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.

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. D2 untersucht 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.

D2 stellt die PACA-Nanopartikel durch anionische Polymerisation her bei einem pH-Wert von 5. Für Insulin konnten keine störenden kovalenten Peptid-Polymer-Bindungen festgestellt werden.

Wurde die anionische Polymerisation bei einem pH-Wert von 1.9 durchgeführt, wurde gefunden, dass nur instabile Insulinhaltige Nanaopartikel mit unregelmäßiger Form und einer inakzeptablen Insulin-Wirkstoffmenge von 4 % isoliert werden konnten.

Im Hinblick auf den Stand der Technik, insbesondere D2 stellte sich die technische Aufgabe, Nanaopartikel bereitzustellen, welche geeignet für die orale Verabreichung von Insulin sind und welche dabei zum einem eine ausreichende Wirkstoffmenge aufweisen und andererseits gute Eigenschaften hinsichtlich der intestinalen Absorption aufweisen.

Es wurde gefunden, dass diese Aufgabe durch die Nanopartikel gemäß Anspruch 1 gelöst wird.

Beispiel 1

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.

0,25 g Insulin wurden in 5 ml Wasser mit einem pH-Wert von 2 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.

Außerdem wurde wahlweise Dextran 10 als Stabilisator hinzugefügt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst wobei I, K, M, O und P Vergleichsbeispiele sind. Die vorteilhaften Effekte von J, L, N sind aus Abbild. 1 ersichtlich.

Examination Committee I: Paper A - Marking Details - Candidate No

Category		Max. possible	Marks Marker	Marker
Independent claims	Product claim	32	32	32
Independent claims	Method for preparing the nanoparticles	24	24	24
Independent claims	Oral dosage and medical use	14	13	13
Dependent claims	Dependent claims	15	10	9
Description	Description	15	10	10
Total			89	88

Examination Committee I agrees on 89 points and recommends the grade PASS