

Verfahren zur Einbringung biologisch aktiver Substanzen ins Gehirn

Die Erfindung betrifft die Entwicklung eines medizinisch-biologischen Verfahrens zur direkten Zustellung von synthetischen und natürlichen biologisch aktiven und medikamentösen Substanzen aus der Nasenhöhle ins Gehirn auf Grund der Wechselwirkung dieser Substanzen und membranaktiver Produkte freiradikaler Natur und/oder den Quellen dieser Produkte mit Nerven- und Gefäßstrukturen der Nasenhöhle.

Die Umwelt stellt eine Quelle der vielfältigen biologisch aktiven Moleküle dar, die in den Organismus mit den Lebensmitteln oder aus der Luftumgebung gelangen. Die anderen wichtigen Quellen der biologisch aktiven Moleküle sind die inneren Quellen des Organismus, solche wie Blut und interstitielle Flüssigkeit. Für das Erreichen der Organstrukturen oder Gewebe müssen die biologisch aktiven Moleküle aus dem äußeren und inneren Milieu die biologischen Membranen durchdringen, zum Beispiel die Membranstrukturen des Gehirns.

Viele biologisch aktiven Moleküle der äußeren und der inneren Umgebung des Organismus sind nützlich und notwendig für das normale Funktionieren der Organe und Gewebe, darunter des Gehirns. Zu den biologisch aktiven Molekülen gehören insbesondere die Mehrheit der Medikamente sowie viele biochemische Verbindungen – die Produkte des Metabolismus, die sich im Organismus bei den Stoffwechselprozessen bilden.

Gleichzeitig stellt die Zustellung ins Gehirn vieler allgemein bekannter und neuer Medikamente, der Biotechnologieprodukte sowie die therapeutische Anwendung einer Reihe von Metaboliten für die Behandlung des zentralen Nervensystems (ZNS), insbesondere des Gehirns, ein ernsthaftes Problem dar. In der wissenschaftlichen und Patentliteratur des letzten Jahrzehntes sind Methoden der Zustellung aus der Nasenhöhle ins Gehirn einiger zentral wirkender Medikamente beschrieben worden (Ming Ming Wen (2011) <http://www.discoverymedicine.com/Ming-ming-Wen/2011/06/13/olfactory-targeting-through-intranasal-delivery-of-biopharmaceutical->

drugs-to-the-brain-current-development/; Costantino H.R. et al. (2007). *Intranasal delivery - Physicochemical and therapeutic aspects. International Journal of Pharmaceutics* 337: 1-24).

In den Arbeiten von Ming Ming Wen und Costantino et. al. sind die bekannten Maßnahmen für die Zustellung der medikamentösen Substanzen aus der Nasenhöhle ins Gehirn beschrieben. Dazu zählt insbesondere die Anwendung der mukoadhäsiven Hilfsstoffe, die das Eindringen durch die Membran verstärken, solchen wie Liposome, Nanopartikel und sogar die Anwendung von Vasokonstriktoren, was keine ausreichende wissenschaftliche Begründung hat.

Mehrere beschriebene Methoden lassen zwar einige kleinen Moleküle ins Gehirn durchdringen, dennoch stellen sie für ein breites Spektrum der medikamentösen Substanzen kein universelles Verfahren dar.

Eine naheliegende bekannte Lösung stellt das Verfahren des transnasalen Transportes medikamentöser Substanzen ins periphere Blut und ins Gehirn für die Behandlung und Immunisierung dar (nach Patent EP 1 031 347 B1). Die Autoren stellen fest, dass die bis jetzt verwendeten Methoden des transnasalen Transportes nicht in der Lage sind, ein überzeugendes Prinzip für den bequemen und annehmbaren Transport pharmazeutisch aktiver Stoffe durch die Membranen der Nasenhöhle zu gewährleisten.

Die Autoren sehen ein wichtiges Element der erfolgreichen Lösung des Problems in der Anwesenheit in der pharmazeutischen Formel von Zytokinen oder deren Quellen. Das von den Autoren verwendete Verfahren stellt jedoch nur einen möglichen Weg für eine nasale Zustellung der Medikamente in den peripherischen Blutkreislauf und/oder ins Gehirn und ein Mittel der Immunisierung dar, und kann nur als pharmakologische und technologische Plattform einer weiteren Verbesserung der nasalen Zustellung der Medikamente für die Therapie der Gehirnerkrankungen dienen.

Die wesentlichen Mängel des beschriebenen Verfahrens bestehen in der Komplexität der Vorbereitung und der Anwendung des Medikaments, sowie eine bestimmte Begrenzung für wasserlösliche Verbindungen. Ein weiterer Mangel dieses Verfahrens besteht in einer komplexen Vorbereitung medikamentöser Komposition.

Früher haben wir festgestellt, dass freiradikale Substanzen oder ihre Folgeprodukte, das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder $\bullet NO$ -aktive Produkte, zum Beispiel L-Arginin in der Lage sind unter bestimmten Bedingungen eine Erhöhung der Durchdringlichkeit von Membranstrukturen der Nerven und Gefäße der Nasenhöhle zu gewährleisten und beim Durchdringen biologisch aktiver Substanzen ins Gehirn beizutragen (Patent DE Nr. 102 48 601, Eurasisches Patent Nr. 010692).

Bislang wurden Formulierungen zur Lösung des technischen Problems vielseitig diskutiert, so auch in dem Artikel (Goldstein N., et al. 2012, *Blood–Brain Barrier Unlocked. Biochemistry (Moscow)*, Vol. 77, No. 5, pp. 419-424). In diesem Artikel wurde zur Bestimmung der Effektivität der Einbringung ins Gehirn der biologisch aktiven Substanz Dopamins bei gleichzeitiger nasaler Einleitung zusammen mit dem mikromolaren Wasserstoffperoxid wurde ein Experiment mit Tritium-markiertem Dopamin (DA) durchgeführt. Es ist allgemein bekannt, dass Dopamin nicht dazu in der Lage ist, unter gewöhnlichen Bedingungen ins Gehirn einzudringen und dort ausgeprägte Effekte auszulösen.

Für die Bestätigung der spezifischen biologischen Aktivität des Dopamins in Gehirnstrukturen wurden tierexperimentellen Untersuchungen mit dem Isotop-Produkt [3H]-Dopamin und mit dem Neuroleptikum Haloperidol durchgeführt. Es ist anbei allgemein bekannt, dass Dopamin nicht in der Lage ist, unter gewöhnlichen Bedingungen ins Gehirn einzudringen und dort ausgeprägte physiologische oder therapeutische Effekte auszulösen. Für die Bestätigung der spezifischen physiologischen Aktivität des Dopamins in Gehirnstrukturen wurden tierexperimentellen Untersuchungen mit dem Isotope-Produkt [3H]-Dopamin und mit dem Neuroleptikum Haloperidol durchgeführt.

Bei der Herstellung des mit Tritium markierten [3H]-Dopamins wurde eine Reaktion des hochtemperierten festphasigen katalytischen Isotopen-Austausches des Wasserstoffes gegen Tritium im Präparat des Dopamin-Hydrochlorids benutzt. Das entstehende Präparat [3H]-DA wurde in der Column Kromasil C18 (8×150 mm) in der Konzentrations-Gradient der wässrigen Lösung des Acetonitrils in der Anwesenheit von 0,1 % Heptafluorbuttersäure gereinigt. Die quantitative Analyse des Präparates wurde durch HPLC unter der Verwendung des DA-Standarts («Sigma/Aldrich») durchgeführt. Die

spezifische Radioaktivität des gleichmäßig markierten DA betrug 20 Ci/Mol. Die Stock-Lösung des Präparates enthielt 10^{-2} M des [^3H]-Dopamins mit der Volumenaktivität von 0,75 mCi/ml.

Bei der Vorbereitung einer nasalen Einleitung der Dopamin-Lösung wurde *ex tempore* das Gemisch aus der [^3H]-DA-Lösung (Konzentration 4×10^{-2} M; die Volumenaktivität 0,75 mCi/ml) mit isotonischer Lösung des stabilisierten Wasserstoffperoxids («Sigma-Aldrich») gemacht. Die Endkonzentrationen des Dopamins und H_2O_2 in nasal eingeführter Lösung betrugen entsprechend 10^{-2} M und 10^{-5} M. In der experimentellen Tiergruppe wurde ein Gemisch von [^3H]-DA- und H_2O_2 -Lösungen eingeführt. Die Tiere in der Kontrollgruppe bekamen ein Gemisch von [^3H]-DA+0,9% NaCl.

Bei der Vorbereitung des biologischen Materials von den Ratten, die drei Minuten nach der nasalen Einleitung von [^3H]-DA-enthaltenden Lösungen dekapitiert wurden, wurde das Gehirn entfernt, Hypothalamus und beide Teile des Striatums wurden ausgeschnitten und auf die kalte Unterlage (+4°C) gebracht. Die herausgenommenen Strukturen des Gehirns wurden in Laufe von 35-40 s abgewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in die Reagenzgläser Eppendorf untergebracht. Die eingefrorenen Proben wurden 48 Stunden lang liophilisiert und anschliessend extrahiert mit 200 μl 0,1M HClO_4 -Lösung. Danach wurden die Proben innerhalb von 15 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und der Supernatant wurde für die Bestimmung von [^3H -DA] und [^3H -DOPAC] verwendet.

Da die Endkonzentrationen von DA und DOPAC in den Proben nicht ausreichend waren, um mit Hilfe der UV-Detektion die radioaktiven Derivate dieser Stoffe im Zusammenhang der Peaks des Plasmas des Blutes zu bestimmen, wurde aus diesem Grund vor der chromatographischen Trennung in den Extrakt des Gewebes jeweils 10 μg nichtmarkierten Standards von Dopamin und sein Metabolit 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) hinzugefügt. Die chromatografische Analyse des Extraktes in 0,1M HClO_4 wurde in der Kromasil Column C18–5 μm (4 $\times$ 150 mm) bei 20° mit Hilfe gradienter Elution mit Acetonitril (4–24 %) in 0,1 % Heptafluorbuttersäure durchgeführt. Die gleichzeitige Detektion auf den Wellenlängen von 254 nm und 220 nm wurden auf dem Spektrophotometer Beckman (Modell 165, Altex) durchgeführt, das Probenvolumen betrug 100 μl . Die Fraktionen der Gehirnextrakte von jedem Tier der

Experimentellen- und Kontrollgruppen, zu denen getrennt [^3H]-DA und [^3H]-DOPAC hinzugefügt wurden, wurde quantitativ mit Flüssigszintillationszähler analysiert.

Auf Abbildung 1 sind die typischen Chromatogramme der extrahierten Lösung, der Hypothalamus- sowie Striatumsextrakte, enthaltend Dopamin und DOPAC dargestellt.

Abb. 1. Die Radioaktivität von [^3H]-DA und [^3H]-DOPAC in chromatographischen Extraktensfraktionen von Hypothalamus und Striatum des Rattengehirns.

Bemerkungen: Die Radioaktivität von [^3H]-DA und [^3H]-DOPAC in chromatographischen Extraktensfraktionen von Hypothalamus und Striatum, die den Standards des Dopamins und DOPAC entsprechen, wurde mit Hilfe des flüssigen Szintillationszählers Tri-Carb 2900TR («PerkinElmer») gemessen. Die Radioaktivität der Extrakte von jeder der acht Ratten der Kontroll- und Experimentellgruppen wurde als Anzahl des radioaktiven Zerfalls pro Minute (DPM) gemessen; für die Umrechnung dieser Werte in Microcurie (μCi) hat man den Umrechnungsfaktor $2,22 \times 10^6$ verwendet. Die Effektivität des Zählers betrug durchschnittlich 49%. Die Umrechnung in die Menge des Dopamins basierte auf der Konzentration der Stock- Lösung [^3H]-DA 10^{-2} M und der Volumenaktivität von $0,75 \mu\text{Ci/ml}$.

Die Katalepsie bei den Ratten wurde durch einmalige intraperitoneale (i.p.) Gabe des Haloperidols («Ratiopharm») in der Dosis von $0,25 \text{ mg/kg}$ entwickelt. Der Katalepsiezustand und die Abwesenheit der Reaktion auf die äußerlichen Reize wurde als 85%-ige Senkung der spontanen motorischen Aktivität bestimmt. Danach wurde den Tieren der drei abgesonderter Ratten-Gruppen eine nasale Applikation der Lösungen von 10^{-2}M Dopamins, 10^{-5}M H_2O_2 oder die Mischung $\text{DA} + \text{H}_2\text{O}_2$ nasal verabreicht. Das Volumen der applizierten Lösungen betrug $50 \mu\text{l}$ in jeden Nasenlauf. Die einmalige Dosis des verabreichten Dopamins betrug $0,8 \text{ mg/kg}$; die Dosis von H_2O_2 betrug dabei 34 ng/Tier . Für die Einschätzung der spontanen Aktivität der Ratten wurde der Test «das offene Feld» verwendet. Der Test-Platz stellte eine runde Arena dar mit dem Durchmesser von 80 cm , mit dem Fußboden aus Holz, der auf 16 gleiche Sektoren und zwei konzentrische Kreise geteilt war. Die Höhe der Barriere betrug 40 cm . Zur Messung der spontanen motorischen Aktivität wurde das Tier ins Zentrum der Arena platziert, und im Laufe von 2 Minuten registrierte man die Anzahl der horizontalen Bewegungen zwischen den Sektoren. Die Beobachtungen fingen 90 s nach der nasalen Verabreichung der Präparate an.

Die Forschung mit den Labortieren entsprach den Forderungen der Ethik-Kommission des Institutes. Ins Experiment wurden 51 Männchen der Ratten „Wistar“ einbezogen mit der Masse von 220–250 g. Die Tiere wurden unter standardmäßigen Bedingungen des Vivariums behandelt mit dem unbeschränkten Zugang zu Nahrung und Wasser. Im Laufe von drei Tagen vor dem Experimentenbeginn zähmte man die Ratten zum Kontakt mit dem Forscher ("handling").

Die statistische Signifikanz (P) bei der Analyse der Anzahl radioisotopischen Zerfalls pro Minute wurde mit Hilfe des nicht parametrischen einseitigen Mann-Whitney-Tests berechnet. Die Ergebnisse galten als signifikant bei $P < 0,05$. In der Forschung des Katalepsie-Modells der Ratten wurde die motorische Aktivität der Tiere als bedingte Einheiten der visualen Registrierung ausgedrückt. Das ließ eine nicht gauß'sche Verteilung der erhaltenen Ergebnisse vermuten.

Die im Hypothalamus und Striatum des Gehirns festgestellte Radioaktivität von [^3H]-DA und [^3H]-DOPAC war wesentlich höher in der experimentellen Gruppen der Ratten, denen nasal und gleichzeitig das Dopamin und H_2O_2 in Form eines Sprays aus der Wasserlösung der beiden Komponente appliziert wurde. In der Tabelle 1 sind die berechneten Konzentrationen von Dopamin und DOPAC im Hypothalamus und Striatum der Versuchs- und Kontrollratten dargestellt. Die Kontrolltiere erhielten im Spray das Dopamin und eine NaCl-Lösung anstatt H_2O_2 (Tab.1).

Tabelle 1. Die Wirkung des micromolaren H_2O_2 auf die nasale Zustellung von Dopamin in die Strukturen des Gehirns bei Ratten.

Tiergruppe	Hypothalamus				Striatum			
	[^3H]-DA ^a	DA ^b	[^3H]-DOPAC ^a	DOPAC ^b	[^3H]-DA ^a	DA ^b	[^3H]-DOPAC ^a	DOPAC ^b
I. Experiment (n=8); [^3H]-DA + H_2O_2	14810 [9687;22558]	18.60 [16.66;24.68]	4653 [4112;9523]	6.31 [5.64;10.76]	24003 [20150;26685]	8.53 [7.43;9.99]	5327 [4478;6179]	1.73 [1.49;2.11]
II. Kontrolle (n=8); [^3H]-DA+NaCl-Lösung	285 [269;302]	0.41 [0.37;0.44]	111 [106;123]	0.15 [0.13;0.16]	887 [872;1014]	0.31 [0.29;0.33]	214 [197;235]	0.07 [0.06;0.08]
III	45.4		42.1		27.5		24.7	
P	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004

Bemerkungen: [^3H]-DA – das mit Tritium markierte Dopamin; [^3H]-DOPAC – die mit Tritium markierte 3,4-Dioxyphenylelessigsäure; ^a – die Anzahl der Zerfälle pro Minute; ^b – pmol/mg der Gewebe. Die Werte sind als Medianen [1.Quartile; 3.Quartile] dargestellt. Die P-Werte wurden mit Hilfe des einseitigen Mann-Whitney-Tests berechnet. Das Volumen der eingeführten Lösung = $2 \times 50 \mu\text{l}$. Die Dosis und die Anzahl der eingeführten Substanzen: DA – 0.8 mg/kg; H_2O_2 – 34 ng.

Die Injektion des Haloperidols in den physiologischen Experimenten hat eine Spontanaktivität der Ratten wesentlich unterdrückt. Die latente Periode der Katalepsie-Entwicklung nach der i.p. Einleitung des Haloperidols betrug 9,4 [8,9; 9,8] Minuten; die Katalepsiedauer betrug 57,1 [54,8; 59,4]. Die nasale Einleitung der Mischung DA+ H_2O_2 rief innerhalb von 90 s eine bedeutende Wiederherstellung der spontanen motorischen Aktivität hervor. Die getrennte Einleitung bei den Kontrolltieren der isotonischen Wasserlösungen des Dopamins oder H_2O_2 hat die motorische Aktivität der Tiere im Laufe der ganzen Periode der Katalepsie nicht wiederhergestellt (Abb. 2).

Abbildung 2. Die Wirkung nasaler Einleitungen des Dopamins zusammen mit H_2O_2 auf die motorische Spontanaktivität der Ratten im Haloperidol-Katalepsie-Modell.

Bemerkungen: HP – Haloperidol; DA – Dopamin; H_2O_2 – Wasserstoffperoxid 10^{-5}M . Eine relative Einheit entspricht der Durchquerung eines Sektors im Test «das offene Feld». Die motorische Spontanaktivität der Ratten: Gruppe (I) – intakte Kontrolle; (II) – nach i.p. Applikation von HP; (III-IV) – nach der nasalen Einleitung der isotonischen Lösung DA oder H_2O_2 ; (V) – nach der Einleitung der Mischung DA+ H_2O_2 . Die Werte in den Gruppen (III-V) wurden auf dem Hintergrund der HP-Wirkung gemessen. Die Anzahl der Ratten in jeder Gruppe $n=7$. Die Tiere in jeder Gruppe (I bis V) wurden getrennt getestet. Die Werte und der Fehler sind als Median [1.Quartile; 3.Quartile] dargestellt. Die P-Werte wurden mit Hilfe des einseitigen Mann-Whitney-Tests berechnet.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass am Beispiel von Dopamin als Test-Substanz bewiesen wurde, dass micromolare Konzentrationen von H_2O_2 , die nasal und gleichzeitig mit Dopamin appliziert worden sind, eine schnelle Zustellung des Dopamins in die Strukturen des Gehirns gewährleisten. So wurde schon 3 Minuten nach der nasalen Einleitung eine signifikante Erhöhung des Dopamingehalts und des Produktes seines Metabolismus – DOPAC im Hypothalamus und Striatum der Ratten beobachtet. Die Dopamin-Peaks auf den HPLC-Chromatogrammen der Extrakte stimmten exakt mit

den Peaks des Dopamin-Standards überein. Nach der nasalen Einleitung des Dopamins in der Mischung mit H_2O_2 wurde im Haloperidol-Katalepsie-Modell eine Erhöhung des Dopamingehalts im Zielorgan – Striatum gezeigt, so dass die charakteristischen motorischen Störungen bei den experimentellen Tieren wirksam verringert wurden.

Eine nasale Einleitung von [^3H]-DA zusammen mit der physiologischen Lösung bei den Kontrolltieren wurde im Gegenteil weder mit der Erhöhung des Dopamininhalts in den Strukturen des Gehirns noch mit der Verminderung der Katalepsie-Merkmale begleitet.

Die kurze Lebensdauer des niedrigmolaren Wasserstoffperoxids H_2O_2 an der Oberfläche der Schleimhaut der Nasenhöhle sowie die Erhaltung der Effekte im Laufe der verhältnismäßig langen Zeit lassen eine Beteiligung eines biochemischen Verstärkers vermuten. Wir haben früher gezeigt (DE 102 48 601), dass der Kandidat für diese Rolle das Stickstoffoxid-Radikal ($\cdot\text{NO}$) sein kann, und dass auch L-Arginin (der Substrat des $\cdot\text{NO}$ -bildenden Enzyms NO-Synthase (eNOS), der zusammen mit dem Dopamin nasal eingeführt wird, in der Lage wie H_2O_2 ist, die motorische Spontanaktivität der Ratten wiederherzustellen. An dieser Stelle ist es wichtig anzumerken, dass L-Arginin in der Nasenhöhle wesentlich langsamer metabolisiert wird als kurzlebige H_2O_2 . Der genaue Mechanismus der Teilnahme von L-Arginin in der Zustellung des Dopamins ins Gehirn bleibt unklar.

Die Erfindung hat sich zur Aufgabe gestellt, ein Verfahren zu schaffen, das die Nachteile des Standes der Technik beseitigt und bei dem biologische und pharmazeutische aktive Stoffe in Form von Arzneimitteln nach der nasalen Applikation durch zeitliche, mengenmäßige und in vorgesehener Reihenfolge direkt ins Gehirn effektiv und vorteilhaft eingebracht werden.

In den folgenden Experimenten, die eine Fortsetzung beschriebener Untersuchungen darstellen, wurde der Bereich der wirksamen Konzentrationen des Wasserstoffperoxides und L-Arginins, sowie zeitliche und mengenmäßige Parameter des Verfahrens dargestellt.

Die Erfindung wird an Hand folgender Experimente erklärt und beschrieben:

Experiment 1. Die nasale Einleitung der Mischung „Dopamin+H₂O₂“ stellt die motorische Spontanaktivität der Ratten nach der intraperitonealen Einleitung des Haloperidols in der Dosis von 100 mg/kg des Körpergewichtes wieder her.

Die Substanzen (nasal): das Dopamin in der Konzentration 10⁻³M bei gleichzeitiger und gemeinsamer nasaler Einleitung mit Wasserstoffperoxid in verschiedenen Konzentrationen in beide Nasenläufe.

Das Kriterium der Bewertung: die Veränderung der motorischen Spontanaktivität als Summe der Bewegungen der Ratten in verschiedenen Gruppen der Tiere im Test „Offenes Feld“.

Die Tiergruppen: Kontrollgruppe: „Intakte Kontrolle“ (Gruppe I), „Haloperidol i.p.“ (Gruppe II), „Haloperidol i.p.+Dopamin“ (Gruppe III) und „Haloperidol i.p.+H₂O₂“ in verschiedenen Konzentrationen (Gruppen IV und V). Experimentelle Gruppe: „Haloperidol i.p.+Dopamin+H₂O₂“ in verschiedenen Konzentrationen (Gruppen VII-IX), Tab. 2).

Tabelle 2. Motorische Spontanaktivität der Ratten nach der intraperitonealen Einleitung des Haloperidols und nasaler Einleitung der Mischung „Dopamin+H₂O₂“.

No.	Tiergruppen	Spontanaktivität
I	Intakte Kontrolle (n=7)	35±8
II	Haloperidol-Kontrolle i.p. (n=9)	3±3 ^{##})
III	Haloperidol i.p. + Dopamin nasal (n=5)	2±1,7 ^{##})
IV	Haloperidol i.p. + H ₂ O ₂ (10 ⁻⁴ M), nasal (n=5)	1,8±2,2 ^{##})
V	Haloperidol i.p. + H ₂ O ₂ (10 ⁻⁵ M), nasal (n=6)	3±1,9 ^{##})
VI	Haloperidol i.p. + (Dopamin+H ₂ O ₂ (10 ⁻⁴ M) nasal (n=6)	35,4±6,6 ^{**})
VII	Haloperidol i.p. + (Dopamin+H ₂ O ₂ (10 ⁻⁶ M) nasal (n=7)	38±7 ^{**})
VIII	Haloperidol i.p. + (Dopamin+H ₂ O ₂ (10 ⁻⁸ M) nasal (n=6)	16±6,5 [*])
IX	Haloperidol i.p. + (Dopamin+H ₂ O ₂ (10 ⁻¹⁰ M) nasal (n=6)	4,1±3,3

Bemerkungen: ^{##}) = $P_{\text{(Gruppen II-V) vs. Gruppe I}} < 0,01$; ^{*}) $P_{\text{(Gruppe VIII) vs. (Gruppe I)}} < 0,05$; ^{**}) = $P_{\text{(Gruppen VI und VII) vs. (Gruppen II-V)}} < 0,01$; $P_{\text{(Gruppe IX) vs. (Gruppen II-V)}} < 0,1$ = nicht signifikant.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde gezeigt, dass die minimale wirksame Konzentration des endonasalen Wasserstoffperoxides H_2O_2 im Bereich zwischen 10^{-8} bis zu 10^{-10}M liegt. Es wurde angenommen, dass die maximale wirksame Konzentration des nasalen Wasserstoffperoxids H_2O_2 beträgt $5 \times 10^{-4}\text{M}$, da in höheren Konzentrationen Schädigungen der Nasenschleimhautstrukturen entstehen können.

Experiment 2. Die nasale Einleitung der Mischung „Dopamin+L-Arginin“ stellt die motorische Spontanaktivität der Ratten nach intraperitonealer Einleitung des Haloperidols in der Dosis von 100 mg/kg des Körpergewichtes wieder her.

Die Substanzen (nasal): das Dopamin in der Konzentration 10^{-3}M bei der synchronen gemeinsamen Einleitung mit L-Arginin in einen Nasenlauf in verschiedenen Konzentrationen. Das Kriterium der Bewertung: die Veränderung der motorischen Spontaneaktivität als Summe der Bewegungen der Ratten in verschiedenen Gruppen der Tiere im Test „Offenes Feld“. Die Tiergruppen: Kontrolltiere: „Intakte Kontrolle“ (Gruppe I), „Haloperidol i.p.“ (Gruppe II), „Haloperidol i.p.+Dopamin nasal“ (Gruppe III) und „Haloperidol i.p. + L-Arginin nasal“ in verschiedenen Konzentrationen (Gruppen IV und V). Experimentelle Gruppe: „Haloperidol i.p.+Dopamin+L-Arginin nasal“ in verschiedenen Konzentrationen (Gruppen VI-VIII), (Tab. 3).

Tabelle 3. Motorische Spontanaktivität der Ratten nach der intraperitonealen Einleitung des Haloperidols und nasaler Einleitung der Mischung „Dopamin+L-Arginin“.

No.	Tiergruppen	Spontanaktivität
I	Intakte Kontrolle (n=8)	37 ± 10
II	Haloperidol i.p. (n=8)	$3,7 \pm 3^{##}$
III	Haloperidol i.p. + Dopamin nasal (n=6)	$2,6 \pm 1,7^{##}$
IV	Haloperidol i.p. + L-Arginin (10^{-3}M), nasal (n=5)	$6,4 \pm 3,4^{##}$
V	Haloperidol i.p. + L-Arginin (10^{-5}M), nasal (n=5)	$4,8 \pm 2,7^{##}$
VI	Haloperidol i.p. + (Dopamin+L-Arginin (10^{-1}M) nasal (n=5)	$29 \pm 8^{**}$
VII	Haloperidol i.p. + (Dopamin+L-Arginin (10^{-3}M) nasal (n=6)	$19 \pm 6,1^{**}$
VIII	Haloperidol i.p. + (Dopamin+L-Arginin 10^{-7}M) nasal (n=6)	$6,2 \pm 4,6$

Bemerkungen: $^{##}) = P_{\text{(Gruppen II-V) vs. Gruppe I}} < 0,01$; $^{**}) P_{\text{(Gruppen VI, VII) vs. (Gruppen II-V)}} < 0,01$; $P_{\text{(Gruppe VIII) vs. (Gruppen II-V)}} < 0,1 = \text{nicht signifikant}$.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass die minimale wirksame Konzentration des endonasalen L-Arginins im Bereich von 10^{-7}M liegt.

Die maximale wirksame Konzentration des L-Arginins bei nasaler Einleitung liegt bei 10^{-1}M , da in den höheren Konzentrationen eine Entstehung der Nebeneffekte von L-Arginin möglich wird.

Ein weiterer wichtiger Parameter physiologischer Reaktion der Rezeptoren ist die Zeit. Die physiologische Reaktion von den Rezeptoren der Nasenhöhle hängt stark von der Dauer des Reizes ab. Während einer kontinuierlichen Stimulation ist eine Reduktion der Reaktion mit physiologischer Anpassung assoziiert. Dies stellt ein wesentliches Problem dar, weil durch die Rezeptor Adaptation gegenüber des einwirkenden Stimulus, zum Beispiel verursacht von H_2O_2 - oder $\bullet\text{NO}$, wird die Empfindlichkeit der Rezeptoren sowie abhängige biologische Reaktion stark verringert (*F.R. Schmidt, G. Thews, 1983. Human Physiology. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York*).

Diese Adaptation kann eine therapeutische Effizienz medikamentöser Substanzen verringern. Ein Verfahren zur Aufrechterhaltung der Sensibilität nasaler Rezeptoren während der Wirkung von H_2O_2 und $\bullet\text{NO}$ ist bisher nicht bekannt. Das von uns entwickelnde Verfahren besteht in kurzzeitiger intermittierenden (unterbrochenen) Wirkung von neuroaktiven Substanzen, zum Beispiel H_2O_2 oder $\bullet\text{NO}$, in einer pharmazeutischen Komposition mit biologischen und therapeutisch aktiven Substanzen auf die Schleimhaut der Nasenhöhle.

Die Anwendung dieses Verfahrens hat in unseren Experimenten die Wirkung des Wirkstoffs Phenobarbitals nach der nasalen Verabreichung synchron mit H_2O_2 deutlich erhöht. Die orale Anwendung des Phenobarbitals ist für die Epilepsie-, bzw. Behandlung von Schlafstörungen seit längerer Zeit bekannt (*P. Kwan, M. J. Brodie: Phenobarbital for the Treatment of Epilepsy in the 21st Century: A Critical Review. Epilepsia 2004;45:1141–1149*). Die Nachteile dieser Behandlung sind die

unerwünschten Nebeneffekte, unter dessen Übelkeit, Schwindel, Erhöhung der P-450-Aktivität im Leber und Störungen beim Metabolismus vieler Arzneimittel.

Experiment 3. Die Wirkung des Phenobarbitals wurde experimentell auf geschlechtsreifen weißen Ratten unter einer nasalen Anwendung untersucht. Verglichen wurde die phenobarbital-bedingte Dauer des Schlafes nach der nasalen Applikation des Phenobarbitals mit und ohne vaso- bzw. neuroaktiver Substanz. Die typischen Ergebnisse einer Untersuchung sind in der Tab. 4 aufgeführt.

Tabelle 4. Vergleich der Schlafdauer bei Ratten nach einmaliger und fraktionierter nasalen Verabreichung von Phenobarbital in Verbindung mit dem neuroaktiven Substanz, Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Tiergruppen	Dauer des experimentellen Schlafes (Minuten nach der letzten Verabreichung)	
	einmalige nasale Applikation der Volldosis 18 mg	dreimalige nasale Applikation von Teildosen 3 × 6 (mg)
Kontrollgruppe (n = 3)	128 ± 11,1	--
Experimentelle Gruppe (n = 4)	--	161 ± 21,1

Bemerkungen: Dosis von Phenobarbital = 90 mg/kg des Körpergewichts; Gesamtvolumen nasal applizierter Lösung = $2 \times 100 \mu\text{l}$; Konzentration von $H_2O_2 = 10^{-5}\text{M}$, Intervall zwischen nacheinander folgenden nasalen Verabreichungen in der experimentellen Tiergruppe = 60 s.

Es ist denkbar, dass die Zahl eingefügten Teildosen und die Pausen zwischen nacheinander eingefügten Teildosen substanzspezifisch bzw. anwendungsspezifisch sind und dabei von 1 bis 5 Teildosen resp. von 10 bis 60 s erreichen können.

Die Erfindung hat nachstehende Vorteile:

- eine direkte Zustellung arzneilicher Substanzen ins Gehirn,
- eine Möglichkeit der Schaffung des breiten Spektrums an Medikamenten, um Erkrankungen des ZNS zu behandeln,

- eine Möglichkeit eines umfassenden und effektiven Einsatzes von generischen Substanzen (ein „drittes Leben“ für Generika),
- erhöhte therapeutische Effizienz von Arzneistoffen im Vergleich zu den bisher bekannten Verfahren,
- ein signifikanter Rückgang der effektiven Dosis des Medikaments und des Risikos von unerwünschten Nebenwirkungen,
- eine Verringerung der Umweltbelastung von biologisch aktiven Substanzen und seiner Abbauprodukten.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Einbringung biologisch aktiver Substanzen ins Gehirn durch nasale Einleitung pharmazeutischer Komposition, bestehend aus biologisch und therapeutisch aktiven Substanzen gemeinsam mit membranaktiven Substanzen, Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid und deren Quellen, die in der Nasenhöhle zersetzt zurückbleiben, wobei nur die pharmakologisch aktiven Substanzen weitergeleitet werden, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Komposition einmal oder mehrfach nasal in Voll- und Teildosen eingeleitet wird, und ein Zeitintervall zwischen den Einleitungen von 3 bis 180 Sekunden, vorzugsweise 60 Sekunden beträgt, und eine Arzneimitteldosierung 2 mal bis 100 mal kleiner als die pharmazeutisch vorgegebene Dosierung beträgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmakologisch aktiven Substanzen synchron und/oder abwechselnd in einen Nasenlauf und/oder in beide Nasenläufe eingeleitet wird und die Anzahl der nasalen Einleitungen 1 bis 5, vorzugsweise 3 beträgt
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch aktive Substanz, die eine regulatorische und therapeutische Wirkung auf die Funktionen des zentralen Nervensystems ausübt, in Form von synthetischen und natürlichen Produkten und/oder einer Komposition dieser Stoffe mit membranaktiven Substanzen, Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid und deren Quellen eingeführt wird.
4. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch aktive Substanzen aus der Gruppe der Regler des Neurotransmitter Systems des Gehirns ausgewählt wird, zum Beispiel, aus der Gruppe der Agonisten und/oder der Antagonisten von Rezeptoren des Dopamins, Serotonins, Histamins oder Acetylcholins.

5. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch aktive Substanz aus der Gruppe der Modulatoren des Neurotransmitter Systems des Gehirns ausgewählt wird, zum Beispiel, die γ -Aminobuttersäure oder Akatinol-Memantin oder ihre Derivate.
6. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch aktive Substanz aus der Gruppe der endogenen Metabolite ausgewählt wird, die eine regulatorische Einwirkung auf die Funktionen des Zentralnervensystem aufweisen, zum Beispiel, Induktoren der endogenen Substanzen, Hormone, Aminosäuren, Opiode und Eiweißstoffe.
7. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch aktiven Substanzen, die auf das zentrale Nervensystem wirken, mit einer Molekularmasse kleiner als 1 kDa ausgewählt werden, zum Beispiel Dopamin, Venlafaxine, Amantadine oder Trimeperidine.
8. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch aktiven Substanzen, die auf das zentrale Nervensystem wirken, mit einer Molekularmasse größer als 1 kDa ausgewählt werden, zum Beispiel Insulin, Galanin-like Peptide, Leptin, L-Asparaginase, Interferone oder Bevacizumab.
9. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch aktiven Substanzen in der Zusammensetzung von Zellen oder Zellstrukturen, zum Beispiel Stammzellen, Immunkomplexe oder monoklonale Antikörper nasal eingeleitet werden.
10. Verfahren nach Patentansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch aktiven Substanzen aus generischen Substanzen ausgewählt werden.
11. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutisch aktiven Substanzen nasal in einer Dosis von 1% bis 100% der allgemeingültigen Dosis verwendet werden.

12. Verfahren nach Patentansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die membranaktive Substanz Wasserstoffperoxid in der Konzentration von 10^{-9}M bis zu 10^{-3}M , bevorzugt in der Konzentration von $5 \times 10^{-4}\text{M}$ bis zu 10^{-6}M nasal verwendet wird.
13. Verfahren nach Patentansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die membranaktive Substanz Stickstoffoxid •NO in der Konzentration von 10^{-7}M bis 10^{-1}M , bevorzugt in der Konzentration von 10^{-4} bis 10^{-1}M nasal verwendet wird.
14. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass in einer nasal eingeführten pharmazeutischen Komposition eine oder mehrere pharmazeutisch aktiven Substanzen in Form von Gel, Salbe, Öl, Suspension, Liposomen oder Nanosomen verwendet werden.
15. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass in einer Zusammensetzung für die nasal eingeführte pharmazeutische Komposition pharmazeutisch akzeptablen Stabilisatoren, Antioxidanten, Gel-bildenden Stoffen, pH-Reglern, osmotischen Reglern, Emulgatoren, Solubilisatoren oder antimikrobiischen Stoffe verwendet werden.
16. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass für nasale Einleitung der pharmazeutischen Komposition Sprays verwendet werden.