

## **3 Methoden**

### **3.1. Ballonkatheter**

#### **3.1.1. Beschichtung mit dem Wirkstoff Paclitaxel**

Die Beschichtung der Ballonkatheter mit Paclitaxel erfolgte grundsätzlich im Tauchverfahren. Der Wirkstoff wurde dazu in ein Glasgefäß eingewogen, das groß genug sein musste, um einen Ballonkatheter bequem aufzunehmen. Danach wurde eine definierte Menge Aceton hinzupipettiert, das Gefäß dicht verschlossen und der Wirkstoff unter Verwendung eines Ultraschallbades gelöst. Teilweise erfolgte ein Zusatz weiterer Substanzen.

Das Gefäß wurde erst direkt vor der Beschichtung wieder geöffnet, um das Verdunsten des Lösemittels und damit die Veränderung der Paclitaxel-Konzentration der Lösung zu vermeiden. Das Tauchen selbst erfolgte dann manuell. Dazu wurde die Schutzhülle des Ballons entfernt und dieser entweder direkt gefaltet getaucht oder aber zuvor expandiert bzw. über Wasserdampf sternförmig aufgefaltet und anschließend getaucht (siehe Abbildungen 15-17, Seite 64). Alle Ballone wurden senkrecht, ohne die Gefäßwand zu berühren, komplett in die Tauchlösung eingeführt. Die Kontrolle der Tauchzeit erfolgte mittels Stoppuhr. Anschließend wurden die Ballonkatheter vorsichtig aus der Tauchlösung genommen. Auch jetzt waren Berührungen mit der Gefäßwand unbedingt zu vermeiden, da sonst eine Beeinträchtigung der Beschichtung zu befürchten war. Die Ballonkatheter wurden nach der Entnahme aus dem Tauchgefäß sofort in eine horizontale Lage gebracht und anschließend an der Luft getrocknet. Teilweise erfolgten mehrfache Wiederholungen der Beschichtungsschritte, um eine dickere Wirkstoffschicht auf den Ballonen zu erhalten. Durchgeführt wurden Tauchversuche mit unterschiedlichen Ballonkathetertypen, Ballonen in verschiedenen Faltungszuständen, variierenden Beschichtungslösungen und unterschiedlich langen Tauchzeiten bzw. -intervallen.

Im einzelnen wurden folgende Beschichtungsversuche durchgeführt:

- a) Kathetertyp: Orbus IV (2,25 mm x 17 mm) der Firma BMT;  
Beschichtungslösung: 20 mg/mL Paclitaxel in Aceton ohne Zusätze;  
Jeweils 2 gefaltete Ballone wurden einmal für 5 Sekunden, einmal für 1 Minute bzw. einmal für 10 Minuten getaucht. Jeweils 2 expandierte Ballone verblieben für 1 Minute in der Beschichtungslösung bzw. wurden nach der Standardmethode (1 Minute tauchen, 3 Stunden trocknen, 3 x 5 Sekunden tauchen gefolgt von je einer Stunde trocknen) behandelt. Ein weiterer Ballon blieb als Leerprobe unbeschichtet.
- b) Kathetertyp: Orbus I - blau (3,5 mm x 20 mm) der Firma BMT;  
Beschichtungslösungen: Jeweils 20 mg/mL Paclitaxel wurden in reinem Aceton bzw. Gemischen aus Aceton, Ethanol und Ultravist<sup>®</sup> 300 gelöst. Der Ethanolanteil dieser Beschichtungsgemische betrug dann stets 10%, der Ultravist<sup>®</sup> 300 - Anteil 0,03% (m/m), 0,3% (m/m) bzw. 3% (m/m). Bei Herstellung dieser Lösungen erwies es sich als günstig, das Ultravist<sup>®</sup> zuerst in Ethanol zu lösen und erst dann mit Aceton zu verdünnen. In jede dieser Beschichtungslösungen wurden je 2 expandierte Ballone nach der Standardmethode (1 Minute tauchen, 3 Stunden trocknen, 3 x 5 Sekunden tauchen gefolgt von je einer Stunde trocknen) und 2 gefaltete Ballone für einmalig 10 Minuten getaucht. Ein weiterer Ballon blieb als Leerprobe unbeschichtet.
- c) Kathetertyp: Orbus IV (2,25 mm x 17 mm) der Firma BMT;  
Beschichtungslösungen: Jeweils 20 mg/mL Paclitaxel wurden in Aceton bzw. 0,03%igen (m/m) und 3%igen (m/m) Salicylsäurelösungen in Aceton gelöst. In jede dieser Beschichtungslösungen wurden je 2 expandierte Ballone nach der Standardmethode (1 Minute tauchen, 3 Stunden trocknen, 3 x 5 Sekunden tauchen gefolgt von je einer Stunde trocknen) und 2 gefaltete Ballone für einmalig 10 Minuten getaucht. Ein weiterer Ballon blieb als Leerprobe unbeschichtet.
- d) Kathetertyp: Orbus IV (2,25 mm x 17 mm) der Firma BMT;  
Beschichtungslösungen: Es wurden 3 Lösungen von Paclitaxel in Aceton hergestellt. Die Wirkstoffkonzentrationen betragen dabei 20 mg/mL, 50 mg/mL und 100 mg/mL. Anzumerken bleibt dazu, dass die Herstellung der Lösungen

unter leichtem Erwärmen (50 °C) auf dem Wasserbad erfolgte. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur waren sie klar, bei der höchsten Konzentration bildete sich aber im Verlauf der Beschichtung ein leichter Bodensatz, weshalb vermutet wird, dass es sich um eine übersättigte Lösung handelte. In jede dieser Beschichtungslösungen wurden je 2 expandierte Ballone nach der Standardmethode (1 Minute tauchen, 3 Stunden trocknen, 3 x 5 Sekunden tauchen gefolgt von je einer Stunde trocknen), 2 gefaltete Ballone nach der Standardmethode (1 Minute tauchen, 3 Stunden trocknen, 3 x 5 Sekunden tauchen gefolgt von je einer Stunde trocknen) sowie 2 gefaltete Ballone für einmalig 10 Minuten getaucht. Ein weiterer Ballon blieb als Leerprobe unbeschichtet.

- e) Kathetertyp: Orbus I - blau (3,5 mm x 20 mm) der Firma BMT;  
Beschichtungslösung: 0,45 mL Ethanol + 100 µL Ultravist<sup>®</sup> 370 + 4,5 mL Aceton + 150 mg Paclitaxel; In diese Lösung wurden 5 expandierte, 5 sternförmig-aufgefaltete und 5 gefaltete Ballone jeweils nach der Standardmethode (1 Minute tauchen, 3 Stunden trocknen, 3 x 5 Sekunden tauchen gefolgt von je einer Stunde trocknen) getaucht. Ein weiterer Ballon blieb als Leerprobe unbeschichtet. Anschließend wurden der Beschichtungslösung 2 mg Sudanrot zugesetzt und damit zusätzlich 1 expandierter, 1 sternförmig-aufgefalteter und 1 gefalteter Ballon beschichtet, um die Gleichmäßigkeit der Beschichtung optisch besser beurteilen zu können.

Um möglichst praxisnah vorzugehen, wurden die beschichteten Ballone wieder in die Schutzhüllen gesteckt, in denen sie transportiert wurden (siehe Abbildung 2, Seite 8). Dazu war es zuvor notwendig, die expandiert und die sternförmig-aufgefaltete beschichteten Ballone wieder zusammenzufalten. Dies geschah nach dem Trocknen per Hand mittels besonders glattem Wägebepapier (Ausnahme Beschichtung a): Aufkleberpapier), um eine Beschädigung der aufgetragenen Schicht soweit möglich zu verhindern.

### **3.1.2. Extraktion und HPLC-Analytik des Wirkstoffs**

Vor der Extraktion des Wirkstoffs wurden die Ballone wieder aus ihren Schutzhüllen entnommen und in je einem Eppendorfgefäß maximal expandiert, um das dabei abfallende Paclitaxel bestimmen zu können. Anschließend wurden sie in andere Eppendorfgefäße überführt und mittels Schere vom Rest des Katheters abgetrennt.

Die Extraktion des Paclitaxels erfolgte stets mit Ethanol. In den Versuchen a) bis d) wurden große Eppendorfgefäße und jeweils 1,5 mL Ethanol verwendet, in Versuch e) kleine Eppendorfgefäße und 1,3 mL Ethanol. Abgelöst wurde der Wirkstoff vom Wäge- bzw. Aufkleberpapier, von den Schutzhüllen (Versuche b) bis e)) und von den Ballonen. Ebenfalls aufgenommen wurde der beim Expandieren der Ballone abgefallene Belag. Zur Verbesserung der Extraktionsbedingungen kamen Schüttler und Ultraschallbad zum Einsatz.

Die Bestimmung des gelösten Paclitaxels erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Als stationäre Phase diente die Säule Waters Symmetrie, C18, 5 microns, 25 cm x 4,6 cm und als Fließmittel wurde eine Mischung aus Acetonitril und 0,005 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer pH 3,5 im Verhältnis 55:45 verwendet. Die Größe der zum Probeneinlass eingesetzten Schleife betrug 20 µL, die Detektionswellenlänge 230 nm. Bei einer Flussrate von 1 mL/min dauerte eine Messung etwa 10 Minuten (Paclitaxelpeak bei ca. 8,3 Minuten). Gemessen wurde gegen einen 20 µg/mL Paclitaxelstandard in absolutem Ethanol.

### **3.1.3. Beschichtung mit dem Farbstoff Indocyaningrün**

Die Beschichtung der Ballonkatheter mit Indocyaningrün erfolgte nicht im Tauchverfahren, sondern mittels Spritze und Kanüle, da hier eine bekannte, genau definierte Farbstoffmenge aufgebracht werden sollte. Dazu wurde das Indocyaningrün in ein Glasgefäß eingewogen und zunächst in einem Teil Ethanol gelöst. Danach wurden 10 Teile Aceton hinzu gegeben, das Gefäß dicht verschlossen und gut gemischt. Zum Einsatz kam dieses Lösemittel einerseits wegen seiner Ähnlichkeit zu dem bei der Wirkstoffbeschichtung verwendeten

Medium und andererseits wegen seiner leichten Flüchtigkeit. Ein Zusatz weiterer Substanzen erfolgte nicht. Aus dieser Stammlösung der Konzentration 500 µg/mL wurden dann durch Verdünnen mit einem Aceton-Ethanol-Gemisch (Verhältnis 9:1) die gewünschten Konzentrationen der Beschichtungslösungen hergestellt.

Die Gefäße wurden erst direkt vor der Beschichtung wieder geöffnet, um das Verdunsten des Lösemittels und damit die Veränderung der Farbstoffkonzentration der Lösung zu vermeiden. Die Beschichtung selbst erfolgte manuell. Dazu wurde die Schutzhülle des Ballons entfernt und dieser direkt im gefalteten Zustand behandelt. Die Farbstofflösung wurde nach und nach mit Hilfe von Spritze (B-Braun omnifix 1,0) und Kanüle oder 100 µL-HPLC-Spritze aufgebracht, wobei immer wieder das Verdunsten des Lösemittels abgewartet werden musste. Dieses konnte durch den sehr vorsichtigen Einsatz eines Föns leicht beschleunigt werden. Anschließend wurden die beschichteten Ballone bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Durchgeführt wurden zwei Beschichtungsversuche mit unterschiedlichen Ballonkathetertypen und je drei verschiedenen konzentrierten Beschichtungslösungen.

Im einzelnen erfolgten folgende Beschichtungsversuche:

- f) Kathetertyp: Orbus IV (2,25 mm x 17 mm) der Firma BMT;  
Beschichtungslösungen: Es wurden 3 Lösungen von Indocyaningrün in Aceton/Ethanol 9:1 hergestellt. Die Farbstoffkonzentrationen betragen dabei 500 µg/mL, 5 µg/mL und 0,05 µg/mL. Alle Lösungen waren klar und in abnehmender Intensität grün gefärbt. Mit je 0,2 Millilitern dieser Lösungen wurden jeweils drei gefaltete Ballone nach der oben beschriebenen Methode beschichtet. Ein weiterer Ballon blieb als Leerprobe unbeschichtet.
- g) Weitere Katheter (Größe: 2,00 mm x 20 mm) der Firma BMT;  
Beschichtungslösungen: Es wurden 3 Lösungen von Indocyaningrün in Aceton/Ethanol 9:1 hergestellt. Die Farbstoffkonzentrationen betragen dabei 0,005 µg/mL, 0,0005 µg/mL und 0,00005 µg/mL. Alle Lösungen waren klar und in abnehmender Intensität leicht grün gefärbt. Mit je 0,2 Millilitern dieser Lösungen wurden jeweils drei gefaltete Ballone nach der oben beschriebenen Methode beschichtet. Ein weiterer Ballon blieb als Leerprobe unbeschichtet.

Um möglichst praxisnah vorzugehen, wurden die beschichteten Ballone nach der Trocknung wieder in ihre Schutzhüllen gesteckt und in den zugehörigen Kunststoffschnecken (siehe Abbildung 1, Seite 7) transportiert.

### **3.1.4. Fluorimetrische Analytik des Farbstoffs**

Die Vermessung der Proben mittels Fluoreszenz-Spektroskopie erfolgte an der Physikalisch-Technischen-Bundesanstalt (PTB) bei einer Anregungswellenlänge von 740 nm, einer Belichtungsdauer von 1 Sekunde und 16-facher Akkumulation. Von jedem Objekt wurden bei einer Belichtungsdauer von einer Sekunde 16 Bilder aufgenommen, addiert und durch die Anzahl 16 dividiert, um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern. Zum Einsatz kamen die optischen Filter LL 800 und LP 780 sowie die Blenden 2,8 / 4 / 5,6 und 8, wobei alle Katheter bei Blende 2,8 vermessen wurden. Die anderen Blenden fanden nur bei der Vermessung der Standards Verwendung. Als Kamera diente die iCCP der Firma Roper Scientific Inc.. Die Messungen wurden so durchgeführt, dass die Spitze der Ballonkatheter stets nach links zeigte. Zunächst wurden die Ballone mit ihrer Schutzhülle in das Blickfeld der Kamera gelegt, befestigt und vermessen. Anschließend erfolgten weitere Messungen bei entfernter Schutzhülle im gefalteten wie auch im expandierten Zustand. Im Versuch f) wurden als Standards 0,5 µg/mL und 0,005 µg/mL Lösungen von Indocyaningrün in Ethanol verwendet, im Versuch g) dagegen die zur Beschichtung eingesetzten Lösungen, die 0,005 µg/mL, 0,0005 µg/mL und 0,00005 µg/mL des Farbstoffes in einem Aceton-Ethanol-Gemisch des Verhältnisses 9:1 enthielten. Die Standardlösungen wurden zur Vermessung in 1 mm dicke und 100 mm breite Küvetten gefüllt, waagrecht ausgerichtet und anschließend mit der Kamera aufgenommen.

Die Fluoreszenzbilder der Versuche wurden mit dem von der PTB erstellten Programm Rheumaausw.exe ausgewertet. Im Versuch f) kam noch die Version 1.5 des von Herrn Diethard Petzelt entwickelten Programms zur Anwendung, im Versuch g) bereits die neue Dateiversion 3.7.80. Die Ballone auf den Bildern wurden komplett eingescannt, so dass die nachfolgenden Berechnungen mit der Summe aller Intensitäten erfolgen konnten.

## **3.2. Röntgenkontrastmittel**

### **3.2.1. Herstellung von Iopromid 400**

Iopromid 400 enthält 0,831 g Iopromid pro mL wässriger Lösung. Das entspricht 400 mg Iod pro mL. Diese Zubereitung wurde aus handelsüblichem Ultravist® 370 durch Zuwiegen von Iopromid-Festsubstanz hergestellt. Zu beachten war dabei, dass die Zugabe von Iopromid zu einer deutlichen Volumenzunahme führte, welche in die Berechnung der Konzentration mit einfließen musste. Deshalb wurde durch Zuwaage einer vorher festgelegten Iopromidmenge und anschließendes Lösen des Feststoffes bewusst eine höher konzentrierte Iopromid-Zubereitung hergestellt, die dann durch portionsweise Zugabe destillierten Wassers auf die gewünschte Konzentration 0,831 g Iopromid pro mL verdünnt wurde.

Abschließend wurde diese Iopromid 400-Zubereitung filtriert und autoklaviert, um gegebenenfalls vorhandene Kristallisationskeime zu zerstören. Dadurch konnte die physikalische Stabilität der Zubereitung erheblich erhöht werden.

### **3.2.2. HPLC-Analytik der in Ultravist® gelösten Wirksubstanz Paclitaxel**

Die Bestimmung von in Ultravist® gelöstem Paclitaxel erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Wichtig war es, die paclitaxelhaltigen Ultravist®-Lösungen vor der Bestimmung 1:10 mit dem verwendeten Fließmittel (Acetonitril: 0,005 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer pH 3,5 = 55:45) zu verdünnen, da sonst zuviel Ultravist® auf die Säule gelangen und dort lange verweilen würde. Da es bei der Detektionswellenlänge von 230 nm eine erhebliche Eigenabsorption besitzt, käme es zur Störung der Paclitaxel-Analytik. Durch die Verdünnung der Proben ließen sich Wirkstoff- und Kontrastmittelpicks wesentlich besser trennen.

Als stationäre Phase diente die Säule Waters Symmetrie, C18, 5 microns, 25 cm x 4,6 cm und als Fließmittel wurde eine Mischung aus Acetonitril und 0,005 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer pH 3,5 im Verhältnis 55:45 verwendet. Die Größe

der zum Probeneinlass eingesetzten Schleife betrug 20 µL, die Detektionswellenlänge 230 nm. Bei einer Flussrate von 1 mL/min dauerte eine Messung etwa 10 Minuten (Paclitaxelpeak bei ca. 8,3 Minuten). Gemessen wurde gegen einen 20 µg/mL Paclitaxelstandard in absolutem Ethanol.

### **3.2.3. Löslichkeitsbestimmung von Paclitaxel in Ultravist®**

Um Aussagen zur Löslichkeit festen Paclitaxels in Ultravistzubereitungen in Abhängigkeit von deren Iopromidkonzentrationen treffen zu können, wurden handelsübliche Ultravist® 300 - und Ultravist® 370 - Lösungen sowie frisch hergestellte Iopromid 400 - Zubereitungen (Herstellung wie unter 3.2.1. beschrieben) als Lösemittel genutzt. Als Iopromidfreier Vergleich kam 5%ige, ebenfalls frisch hergestellte Mannitollösung zum Einsatz.

Das beim Versuch verwendete Paclitaxel stammte aus einer bei -20°C tiefgekühlt in Fertigspritzen gelagerten ethanolischen Paclitaxellösung. Diese Lösung enthielt 17,08 mg/mL Paclitaxel in absolutem Ethanol. Jeweils 20 µL dieser Stammlösung wurden in kleine Eppendorfgefäße mit ca. 1,3 mL Fassungsvermögen überführt. Anschließend wurde der Ethanol unter Vakuum komplett abgedampft, so dass jedes Eppendorfgefäß 0,3416 mg Paclitaxel enthielt. Dieses Verfahren wurde gewählt, da die Einwaage so kleiner Wirkstoffmengen kaum zuverlässig möglich gewesen wäre.

Zu den 0,3416 mg Paclitaxel wurden dann in jedes Eppendorfgefäß 1 mL des entsprechenden Lösemittels gegeben. Die Mengeverhältnisse wurden dabei bewusst so gewählt, dass mit Sicherheit davon auszugehen war, dass mehr Paclitaxel vorhanden als löslich war.

Anschließend wurden die Proben kurz per Handschüttler aufgeschüttelt, dann für 30 Minuten in das Ultraschallbad gestellt, eine Stunde bei einer Schüttelfrequenz von 200 Umdrehungen pro Minute auf dem Laborschüttler bewegt, für 15 Minuten nochmals in das Ultraschallbad gestellt und anschließend über Nacht (16 Stunden) bei 200 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Am nächsten Morgen folgten im Wechsel weitere 2 x 15 Minuten im Ultraschallbad und 2 x 30 Minuten auf dem



Schüttler. Durch dieses Vorgehen sollten die Agglomeratbildung des Wirkstoffs vermieden und seine gleichmäßige Verteilung im Lösemittel erreicht werden, um bestmögliche Lösungsbedingungen zu gewährleisten und die Schwankungen der Löslichkeit innerhalb der Proben eines Lösemittels so gering wie möglich zu halten.

Danach wurden die Proben 15 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert, um bereits die Hauptmenge des ungelösten Paclitaxels abzutrennen. Der Überstand jeder Probe wurde anschließend mittels Kanüle in eine 1 mL-Kunststoff-Spritze aufgenommen und durch einen Spritzenaufsatz mit 0,45 µm Celluloseacetat-Filter filtriert. Das Filtrat war stets optisch klar, enthielt also nur noch den gelösten Wirkstoff. Die HPLC-Analytik der in Ultravist® gelösten Wirksubstanz Paclitaxel erfolgte wie unter 3.2.2. beschrieben.

#### **3.2.4. Herstellung übersättigter Paclitaxelzubereitungen in Kontrastmitteln**

Übersättigte Lösungen wurden hergestellt, um höherkonzentrierte Paclitaxelzubereitungen in Ultravist® zu erhalten, welche auch für In-vivo-Versuche einsetzbar waren, weil in ihnen der Wirkstoff in therapeutischen Konzentrationen vorlag.

Das Lösemittel wurde bei diesem Verfahren vorgelegt. Verwendung fanden neben handelsüblichen Ultravist® 370 -, Magnevist® - und Gadovist® - Lösungen, frisch hergestellte Iopromid 385 - und Iopromid 400 - Zubereitungen (Herstellung wie unter 3.2.1. beschrieben) sowie zum Vergleich physiologische Kochsalzlösung, 1,05 M Saccharose-Lösung und Natriumcarboxymethylcelluloselösung mit der gleichen Viskosität wie die Iopromid 400 - Zubereitung. Der Wirkstoff Paclitaxel wurde diesen Medien als Lösung in Ethanol zugesetzt. Bezogen auf das Volumen der endgültigen Zubereitung war der Ethanolgehalt kleiner oder gleich 1%.

Bei der Herstellung dieser übersättigten Lösungen erwies es sich als wichtig, dass nach Zugabe der ethanolischen Paclitaxellösung umgehend geschüttelt wurde, da sonst die Gefahr der Wirkstoffausfällung bestand. Für die In-vivo-Versuche wurden diese übersättigten Zubereitungen stets unmittelbar vor der Applikation hergestellt.

### **3.2.4.1. Überprüfung der physikalischen Stabilität**

Zur Überprüfung der physikalischen Stabilität übersättigter Paclitaxelzubereitungen in Kontrastmitteln wurden Lagerungsversuche durchgeführt. Die Herstellung der Proben erfolgte wie unter 3.2.4. beschrieben. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt in Kunststoffgefäßen bei Raumtemperatur. Die Überprüfung der physikalischen Stabilität erfolgte im Abstand weniger Tage durch optische Kontrolle. Als Kriterium für den Verlust der physikalischen Stabilität galt dabei die Bildung eines flockigen Niederschlages in der Probe.

### **3.2.4.2. Teilchengrößenbestimmung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)**

Wechselwirkungen zwischen Iopromid- und Paclitaxelmolekülen in wässriger Lösung könnten zur Bildung von Mizellen oder anderen supramolekularen Strukturen führen. Dies wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) untersucht.

Die Probenzubereitung erfolgte unmittelbar vor Durchführung der Analyse. Mittels 1 mL-Einwegspritze mit Kanüle wurden 0,5 mL einer 17,08 mg/mL Paclitaxellösung in absolutem Ethanol bzw. zum Vergleich 0,5 mL wirkstofffreien absoluten Ethanols aufgezogen und anschließend durch den geschlossenen Stopfen der handelsüblichen Ultravist<sup>®</sup> 370-Flaschen (50 mL) injiziert. Es wurde sofort geschüttelt und umgehend mit dem Autosizer 4700 von Malvern Instruments vermessen.

### **3.2.5. Überprüfung der Lagerungsstabilität von Paclitaxel in Ethanol**

Um übersättigte Paclitaxellösungen in Ultravist<sup>®</sup> frisch zubereiten zu können (wie unter 3.2.4.1. beschrieben), erwies es sich als hilfreich, die ethanolische Paclitaxellösung der Konzentration 17,08 mg/mL bereits portioniert vorrätig zu halten. In zwei Lagerungsversuchen wurde die Langzeitstabilität dieser ethanolischen Paclitaxellösungen untersucht. Die Lösungen wurden bei unterschiedlichen

Temperaturen in Fertigspritzen mit und ohne Eisessigzusatz oder in 1,5 mL HPLC Probengefäßen gelagert. Nach Abschluss der Lagerung erfolgte die Prüfung auf Gehalt, Abbauprodukte, physikalische Stabilität, Volumenkonstanz und bei den Fertigspritzen auch auf Stopfengleitfähigkeit.

Die Probenerstellung erfolgte in der Krankenhausapotheke des Virchow-Klinikums. Zunächst wurden die entsprechenden Stammlösungen durch Einwaage der Festsubstanz Paclitaxel und Lösen in absolutem Ethanol, mit oder ohne 0,07% (V/V) Eisessigzusatz, hergestellt. Von diesen Lösungen wurden dann mittels 1 mL-Spritze mit aufgesetzter Kanüle jeweils etwa 1 mL-Portionen in jedes Probengefäß eingefüllt. Die Befüllung der Fertigspritzen erfolgte über die vordere (die spätere Austritts-) Öffnung, die der HPLC-Gefäße durch ihre normale Öffnung. Anschließend wurden alle Proben gewogen.

Die Lagerung der Proben erfolgte im ersten Versuch lichtgeschützt in den temperaturkontrollierten Klimaschränken der Schering AG Berlin bei -20°C, 2-8°C, 25°C, 40°C bzw. 60°C und im zweiten Versuch ebenfalls lichtgeschützt bei -20°C bzw. Raumtemperatur in den Räumen der Firma AnaKat GmbH. Die Proben wurden zu den im Versuchsplan festgelegten Zeitpunkten entnommen und nach kurzer Akklimatisierung erneut gewogen. Durch den Vergleich der Masse vor Beginn und nach Ende der Lagerung ließen sich wichtige Rückschlüsse auf die Volumenkonstanz in den Proben ziehen. Die physikalische Stabilität der Lösungen wurde durch optische Kontrolle, die Stopfengleitfähigkeit durch Bewegung per Hand geprüft.

Die Prüfungen auf Gehalt und Zunahme der Abbauprodukte während der Lagerung erfolgten mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Bevor die Paclitaxelanalytik durchgeführt werden konnte, mussten die Proben verdünnt werden. Deshalb wurden mit Hilfe einer GC-Spritze 25 µL der gelagerten Lösung entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 975 µL absolutem Ethanol verdünnt und anschließend gut geschüttelt.

Um die entstandenen Abbauprodukte möglichst gut vom Wirkstoff Paclitaxel und voneinander abtrennen zu können, wurde bei der HPLC-Analytik auf ein Fließmittelgemisch aus Acetonitril und 0,005 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer

pH 3,5 im Verhältnis 40:60 als Fließmittel zurückgegriffen. Als stationäre Phase diente auch hier die Säule Waters Symmetrie, C18, 5 microns, 25 cm x 4,6 cm. Die Größe der zum Probeneinlass eingesetzten Schleife betrug 20 µL, die Detektionswellenlänge 230 nm. Bei einer Flussrate von 1 mL/min dauerte eine Messung jetzt etwa 100 Minuten (Paclitaxelpeak bei ca. 43 Minuten). Gemessen wurde gegen einen 20 µg/mL Paclitaxelstandard in absolutem Ethanol. Die lange Messdauer wurde erforderlich, da das letzte Abbauprodukt erst nach knapp 100 Minuten den Detektor passierte. Hätte man die Messung eher abgebrochen, so wäre dieses Produkt nicht mehr erfasst worden und hätte außerdem die nachfolgenden Messungen gestört.

### **3.2.6. In-vivo-Untersuchungen zur Wirkstoffaufnahme**

Im Tierversuch wurde der Transfer des Paclitaxels in die Gefäßwände von Schweinekoronararterien nach intrakoronarer Injektion Paclitaxel enthaltender Ultravist®-Zubereitungen untersucht [65].

Männliche kastrierte Hausschweine (23-26 kg) wurden durch eine intramuskuläre Injektion von Ketamin und Xylazin vorbereitet und erhielten dann über einen venösen Zugang eine Propofol-Injektion, mit welcher die Anästhesie eingeleitet wurde. Diese wurde nach Intubation durch die Gabe von 1,0-2,0% (V/V) Isofluran, 70% (V/V) N<sub>2</sub>O und 30% (V/V) Sauerstoff fortgeführt. Alle Tiere erhielten 5.000 Einheiten Heparin, 250 mg Acetylsalicylsäure und Nitroglycerin (intrakoronar). Tiere, die später gelöstes Taxol™ erhalten sollten, wurden mit 125 mg Prednisolon-21-hydrogensuccinat i.v. vorbehandelt. Das erschien notwendig, da Taxol® den O/W-Emulgator Cremophor EL enthält, um das sehr lipophile Paclitaxel durch Aufnahme in Mizellen in Lösung zu bringen. Cremophor EL kann allergoide Reaktionen auslösen, sofern nicht mit Kortikoiden vorbehandelt wird. Die Darstellung der Koronararterien erfolgte angiographisch.

Es wurde entsprechend der Behandlung von Patienten bei der koronaren Angioplastie und Stentimplantation vorgegangen. Die Auswahl der Katheter erfolgte entsprechend der jeweiligen Gefäßgröße. Verwendet wurden Orbus Ballon Katheter

(18 mm x 3,0 bzw. 3,5 mm) der Firma BMT (Bavaria Medizin Technologie), auf denen sich Stents befanden. Diese Stents wurden unter sanfter Überdehnung in die linken Koronararterien LAD (left anterior descending) und CX (circumflex) implantiert, um die Bildung einer intimalen Hyperplasie zu stimulieren.

Jeweils 3 Tiere wurden zufällig einer der 5 Testgruppen zugeordnet.

Gruppe A erhielt Paclitaxel 200  $\mu\text{M}$  (170,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in 80 mL Ultravist<sup>®</sup> 370, Gruppe B 100  $\mu\text{M}$  (85,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in 80 mL Ultravist<sup>®</sup> 370, Gruppe C 200  $\mu\text{M}$  (170,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in 40 mL Ultravist<sup>®</sup> 370 und Gruppe D 200  $\mu\text{M}$  (170,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in 5 bis 6 mL Ultravist<sup>®</sup> 370. In Gruppe D wurde zusätzlich wirkstofffreies Ultravist<sup>®</sup> 370 gegeben. Die Ultravist<sup>®</sup>-Paclitaxel-Zubereitungen wurden, wie unter 3.2.4. beschrieben, frisch hergestellt und nach der Stentimplantation selektiv durch die Katheter in die linke Koronararterie injiziert. In Gruppe E wurde zum Vergleich eine kontrastmittelfreie, auf dem Fertigarzneimittel Taxol<sup>®</sup> basierende Zubereitung (10 mL, 1405  $\mu\text{M}$  (1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Paclitaxel) nach Stentimplantation gegeben. Der Eingriff selbst wurde unter Gabe wirkstofffreien Kontrastmittels durchgeführt.

10 Minuten nach der letzten intrakoronaren Injektion wurde jeweils eine Blutprobe genommen. Anschließend erfolgte die Tötung der Tiere mit 3 M Kaliumchloridlösung. Die Herzen wurden schnell entnommen und die Abschnitte der Koronararterien mit den Stents freipräpariert. Nach Einführung eines weichen Plastikstabes (Durchmesser 1,5 mm) in die Gefäßlumen ließen sich die Gefäßabschnitte mit dem Stent bis 1,5 cm proximal und distal gut entnehmen. Außerdem wurden 1,5 cm-Stücke der nicht mit Stent und Injektionen behandelten rechten Koronararterien sowie Proben des Myokardgewebes (bis 700 mg) nahe der LAD bzw. CX entnommen. Plasmaproben wurden aus 10 mL mit Heparin behandelten Blutes genommen, welches vor der ersten Kontrastmittelgabe durch den Führungskatheter bzw. 10 Minuten nach der letzten intrakoronaren Injektion entnommen wurde. Alle Proben wurden umgehend bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Um die Paclitaxelanalytik zu ermöglichen, wurden die Gewebeproben homogenisiert und der Wirkstoff anschließend mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert. Von jeder Plasmaprobe wurde 1 mL abgenommen und in ein Kunststoffröhrchen überführt. Die Paclitaxelextraktion aus dem Plasma erfolgte durch zweifaches Ausschütteln mit

Diethylether (2 bzw. 1 mL). Die beiden organischen Phasen wurden abgenommen, vereinigt und bei Unterdruck komplett abgedampft. Der zurückbleibende feste Rückstand wurde in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (50:50) aufgenommen. Die Kontrolle der Wirkstoffextraktion aus den Plasmaproben erfolgte über einen zuvor zugesetzten internen Docetaxelstandard (1 µg/mL).

Alle Proben wurden mittels HPLC analysiert. Zum Einsatz kamen eine Waters Symmetry Säule C18, 5 µm, 25 x 4,6 mm und ein Fließmittel, welches aus Acetonitril und 0,005 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer pH 3,5 (Mischungsverhältnis 40:60 für Plasmaproben, Paclitaxel-Retentionszeit 30-40 Minuten bzw. 55:45 für Gewebeproben, Paclitaxel-Retentionszeit etwa 7,5 Minuten) bestand. Die Detektion erfolgte mittels UV-Photometrie bei einer Wellenlänge von 230 nm.

### **3.3. Magnetite**

#### **3.3.1. Beschichtung von Magnetiten**

Die Beschichtungsversuche erfolgten mit SHU 555 A-Partikeln der Firma Schering AG Berlin. Bei der Stammlösung handelte es sich um eine 0,5 molare Resovist-Zubereitung, die zur Beschichtung 1:10 mit 5%iger Mannitollösung verdünnt wurde. Als Vergleich dienten stets Leerproben mit reiner 5%iger Mannitollösung.

Die Beschichtung selbst erfolgte in Eppendorfgläsern, indem zunächst 950 µL der zu beschichtenden Zubereitungen vorgelegt wurden. Anschließend wurden 50 µL einer der jeweiligen Versuchsplanung entsprechend konzentrierten Paclitaxellösung in absolutem Ethanol hinzupipettiert. Diese Lösungen wurden durch Verdünnung aus einer bei -20°C gelagerten Stammlösung (17,08 mg/mL) hergestellt und enthielten 42,7 µg bzw. 427 µg Wirkstoff pro 50 µL.

Die Proben wurden umgehend auf dem Handschüttler aufgeschüttelt und danach für etwa 30 Minuten in das Ultraschallbad gestellt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen, bevor sie für etwa 20 Stunden bei einer Schüttelfrequenz von 200 Umdrehungen pro Minute beschichtet wurden.

#### **3.3.2. Separation beschichteter Magnetite von überschüssigem Wirkstoff**

Zur Bestimmung der auf die Magnetite aufgetragenen Paclitaxelmenge ist es notwendig, gelöstes und ausgefallenes Paclitaxel aus dem sie umgebenden wässrigen Medium zu entfernen. Beides darf durch die HPLC-Analytik nicht mit erfasst werden.

Es zeigte sich, dass das ausgefallene und das gelöste Paclitaxel durch Extraktion mit Ether abgetrennt werden kann (siehe 4.3.1.). Da allerdings nicht ganz sicher ist, ob dabei nicht auch etwas ursprünglich an die Magnetite adsorbiertes Paclitaxel in Lösung gehen und somit der Etherextraktion zugänglich werden könnte, wurde als

zweites mögliches Verfahren die Separation der beschichteten Magnetite über eine Magnetsäule untersucht.

#### **3.3.2.1. Extraktion mit Ether**

Die Separation der beschichteten Magnetite von überschüssigem Wirkstoff durch Etherextraktion basiert auf der guten Löslichkeit freien Paclitaxels in Diethylether, während der gebundene Wirkstoff mit den Magnetiten in der wässrigen Phase verbleiben soll.

Die Beschichtungszubereitungen (siehe 3.3.1), die neben dem Paclitaxel, das auf die Magnetite aufgebracht wurde, auch im wässrigen Medium gelöstes und ausgefallenes Paclitaxel enthielten, wurden mit Diethylether ausgeschüttelt. Zum Vergleich wurde ebenso mit einer 5%igen Mannitollösung gleichen Paclitaxelgehaltes verfahren, um den prozentualen Fehler des Extraktionsverfahrens erfassen zu können.

Es wurden jeweils 0,5 mL der Beschichtungszubereitung bzw. der Mannitollösung mit 0,5 mL Diethylether versetzt. Nach kurzem Schütteln auf dem Handschüttler wurden die Proben für 30 Minuten bei einer Schüttelfrequenz von 200 Umdrehungen pro Minute auf dem Laborschüttler bewegt. Anschließend wurde die Etherphase abpipettiert und in einem Eppendorfgefäß aufbewahrt, die wässrige Phase 2 weitere Male wie beschrieben mit Ether extrahiert. Die 3 Etherphasen wurden vereinigt und bei Unterdruck abgedampft. Der Paclitaxelrückstand konnte in Ethanol aufgenommen und mittels HPLC vermessen werden. Die wässrige Phase mit den Magnetiten wurde einer Vakuumevaporation unterzogen (siehe letzter Absatz von 3.3.3.), der verbleibende Rückstand extrahiert und analysiert (siehe 3.3.4.).



### 3.3.2.2. Separation mit Magnetsäulen

In diesem Verfahren wurden MACS<sup>®</sup> LS Columns der Firma Miltenyi Biotec und ein MidiMACS<sup>™</sup> Separator zur Gewinnung der beschichteten Magnetite aus den Beschichtungszubereitungen (siehe 3.3.1.) eingesetzt.

Diese Säulen wurden zunächst mit 5 mL einer 5%igen Mannitollösung gespült, bevor die jeweilige Probe bei angelegtem Magnetfeld auf die Säule gegeben werden konnte. Neben den Beschichtungszubereitungen (siehe 3.3.1.) fanden zum Vergleich auch identisch behandelte, aber magnetitfreie 5%ige Mannitollösungen Verwendung. Nach dem Aufbringen der Probe wurde dreimal mit 5%iger Mannitollösung gespült (5, 2, 2 mL). Danach wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und mit weiteren 1,1 mL der 5%igen Mannitollösung gespült. Dieses, die Magnetite enthaltende Eluat, wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Anschließend erfolgte eine gründliche Spülung der Säule mit Aqua dest., Isopropanol und 5%iger Mannitollösung, bevor das Magnetfeld wieder angelegt und die nächste Probe aufgebracht werden konnte. Neben dem Eluat der eigentlich relevanten Magnetitfraktion wurden auch Proben sämtlicher Spüllösungen zur Kontrolle analysiert.

Im aufgefangenen Eluat wurde photometrisch zunächst der Eisengehalt und anschließend mittels HPLC der Paclitaxelgehalt bestimmt, um die Beladung der Magnetite mit dem Wirkstoff zu ermitteln.

Um den Eisengehalt photometrisch bestimmen zu können, wurden zunächst 10 µL der Proben in ein Kunststoffröhrchen pipettiert und mit 1 mL eines direkt vorher hergestellten Gemisches aus 6 N Salzsäure und 30%iger Wasserstoffperoxid-Lösung (Mischungsverhältnis 1 mL:1 µL) versetzt. Es wurde gut geschüttelt und 30 Minuten abgewartet, um eine vollständige Reaktion zu ermöglichen. Ebenso wurde mit Standardlösungen verfahren, die 1, 2, 4 und 8 g/L Eisen enthielten. Die Bestimmung des Eisengehaltes erfolgte anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 410 nm mittels Einstrahl-Photometer. Zunächst wurde mit Hilfe einer Vergleichsküvette, gefüllt mit reinem Lösemittel, bei der ausgewählten Wellenlänge der Nullwert eingestellt. Danach konnte die Extinktion der Standards

und der Proben gemessen werden. Aus den Standardwerten ergab sich die Regressionsgerade, aus der sich der Eisengehalt der Probenlösungen ermitteln ließ.

### **3.3.3. Aufbereitung der beschichteten Magnetite zur Analytik**

Nach der Separation der beschichteten Magnetite vom überschüssigen Wirkstoff der Beschichtungslösung stellte sich die nächste Herausforderung, den auf den Partikeln befindlichen Wirkstoff der HPLC-Analytik zuzuführen. Dazu musste eine Methode gefunden werden, die Magnetite zu entfernen, da diese voraussichtlich die HPLC-Säule nicht passieren könnten.

Ein Ansatz bestand darin, die Magnetite zunächst von der wässrigen Phase abzutrennen, um dann den Wirkstoff von ihnen abzulösen und der Analytik zuzuführen.

Mit einer herkömmlichen Laborzentrifuge (16.000 x g) lassen sich Magnetite aufgrund ihrer geringen Teilchengröße (50-60 nm bei Resovist<sup>®</sup>) nicht abzentrifugieren. Deshalb erfolgten zunächst Abtrennversuche mittels Ultrazentrifuge (220.800 x g). Dieses Verfahren erwies sich zwar als möglich, aber infolge des großen Zeit- und Arbeitsaufwandes auch als wenig praktikabel.

Eine weitere im Vorversuch untersuchte Möglichkeit der Magnetitabtrennung war das Ausfällen mit organischen, mit Wasser mischbaren Lösemitteln (z.B. Ethanol). Die Resovist<sup>®</sup>-Magnetite sind mit Carboxydextran umhüllt, wodurch eine hydrophile äußere Hüllschicht die Dispergierung im wässrigen Medium ermöglicht. Durch den Zusatz des Überschusses eines organischen, mit Wasser mischbaren Lösemittels verloren die Magnetite ihre stabilisierende Hydrathülle und fielen aus. Der Überstand konnte nun problemlos abgetrennt werden. Nachteilig bei diesem Verfahren ist allerdings, dass ein relativ großer Überschuss des organischen Lösemittels im Vergleich zur wässrigen Phase erforderlich ist. Würde das Paclitaxel dabei quantitativ von den Magnetiten abgelöst, müsste man mit einem relativ großen Volumen stark verdünnter Paclitaxellösung hantieren. Deshalb wurde auch diese Methode nicht weiter verwendet.

Als praktikables Verfahren erwies sich dagegen die Vakuumevaporation. Die wässrige Phase, in der sich nach der Extraktion mit Ether (siehe 3.3.2.1.) beziehungsweise der Separation mit Magnetsäulen (siehe 3.3.2.2.) die beschichteten Magnetite befanden, wurde unter Vakuum in etwa 48 Stunden zunächst komplett abgezogen. Die Magnetite verblieben im festen Rückstand. Anschließend konnte das Paclitaxel mit einem definierten Ethanolvolumen von den Magnetiten gelöst und mittels HPLC quantitativ erfasst werden. (siehe 3.3.4.)

### **3.3.4. Extraktion und HPLC-Analytik der aufgebrauchten Wirksubstanz Paclitaxel**

Nachdem das Wasser aus den wirkstoff- und mannitolhaltigen Magnetitzubereitungen bzw. den wirkstoffhaltigen Mannitollösungen entfernt worden war, konnte mit der Extraktion des Wirkstoffs Paclitaxel aus den festen Rückständen begonnen werden.

Die Extraktion erfolgte je nach Versuch und erwarteter Paclitaxelmenge mit 0,5 oder 1 mL absoluten Ethanols. Die Rückstände wurden darin aufgenommen, die Proben etwa 1 Minute auf dem Handschüttler geschüttelt und anschließend für etwa 10 Minuten in das Ultraschallbad gestellt, wodurch das Paclitaxel quantitativ im Ethanol gelöst wurde. Die Vollständigkeit der Extraktion nach diesem Verfahren war in einem Vorversuch mit bekannten Wirkstoffmengen gezeigt worden. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile (Mannitol und Magnetite) abzentrifugiert. In Ethanol bildeten die Magnetite beim Zentrifugieren (16.000 x g) schnell einen gut abtrennbaren Niederschlag.

Aus dem Überstand erfolgte die Paclitaxelbestimmung mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Als stationäre Phase diente die Säule Waters Symmetrie, C18, 5 microns, 25 cm x 4,6 cm und als Fließmittel wurde eine Mischung aus Acetonitril und 0,005 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer pH 3,5 im Verhältnis 55:45 verwendet. Die Größe der zum Probeneinlass eingesetzten Schleife betrug 20 µL, die Detektionswellenlänge 230 nm. Bei einer Flussrate von 1 mL/min dauerte eine

Messung etwa 10 Minuten (Paclitaxelpeak bei ca. 8,3 Minuten). Gemessen wurde gegen einen 20 µg/mL Paclitaxelstandard in absolutem Ethanol.