

II. Einarbeitung von Arzneistoffen in parenterale Fettemulsionen und Charakterisierung der Systeme

4 Einarbeiten von Amphotericin B in parenterale O/W-Emulsionen

Das Inkorporieren von Amphotericin B in eine Fettemulsion stellt eine große Herausforderung dar. Da das membranaktive Amphotericin B sowohl in wässrigen als auch in öligen Medien (s. Kap. 4.6.1) sehr schlecht löslich ist, ist das Ziel die Einbringung in die Lecithinschicht. Bei der Einarbeitung sollte auf die Verwendung von organischen Lösungsmitteln verzichtet werden. Daher musste ein Weg gefunden werden, den labilen Arzneistoff gut in die Emulsionen zu inkorporieren, ihn dabei jedoch einer möglichst geringen chemischen und thermischen Belastung auszusetzen. Es wurde der Weg der Hochdruckhomogenisation gewählt (s. Kap. 3.1.1). Zum einen wird durch dieses Verfahren die Sättigungslöslichkeit erhöht, zum anderen - und weitaus wichtiger - die Lösungsgeschwindigkeit des Arzneistoffes (vgl. 3.1.3). Die Einbettung in die hydrophoberen Bereiche der Phospholipidschicht wird somit erleichtert. Bei einer entsprechenden Einlagerung in die Lecithinschicht kann einerseits eine chemische Stabilisierung des Arzneistoffes erfolgen, andererseits das Nebenwirkungsprofil günstig beeinflusst werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Arbeit von Schmidt zur Entwicklung einer Amphotericin B-Emulsion weiterzuführen. Dabei sollte ein Produkt entstehen, das unkompliziert und kostengünstig in der Herstellung sowie anwenderfreundlich ist und bei dem der Arzneistoff effektiv in die Emulsion inkorporiert wird.

4.1 Rezepturscreening zur Herstellung Amphotericin B-haltiger Fettemulsionen

4.1.1 Ausgangssituation

Schmidt (2002) zeigte die ersten Schritte der Entwicklung einer Amphotericin B-haltigen Emulsion. Er hatte den Arzneistoff über die Direkthomogenisation (vgl. Kap. 3.1.3) in Lipofundin[®] N 20% unter Verwendung unterschiedlichen Homogenisationsdrucks und unterschiedlicher Temperaturen eingebracht. Aufgrund von physikalischen Instabilitäten führte Schmidt einen Umweg über kleinere Amphotericin B-Partikel ein. Die Entwicklung einer Amphotericin B-haltigen Nanosuspension und deren Einarbeitung in Lipofundin[®] lieferten deutlich bessere Ergebnisse. Schmidt untersuchte die physikalische und chemische Stabilität der Emulsionen unter verschiedenen Prozessparametern (Produktionstemperatur, Produktionszyklen sowie Variation des Homogenisationsdrucks) und Rezepturzusammensetzungen. Aus physiologischen Überlegungen wurde die Fettphase von LCT auf ein 50%iges Gemisch aus LCT und MCT umgestellt und die Konzentration von 20% auf 10% Fett gesenkt. Emulsionen mit 10% Fettgehalt, die aus einer Amphotericin B-haltigen Nanosuspension (2,5% Feststoffanteil und 2,4% Eilecithin als Emulgator) bei einem Homogenisationsdruck von 600 bar, einer Temperatur von 45 °C und 10 Homogenisationszyklen hergestellt wurden, zeigten einen Arzneistoffgehalt von 73-90% nach Autoklavieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die von Schmidt gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Emulsionsentwicklung mit Amphotericin B und der Wirkstoffstabilisierung weiter vertieft. Die Formulierungsoptimierung, -stabilität und detaillierte Untersuchung des Arzneistoffsystems standen hier im Vordergrund.

Zunächst sollten weitere Variationen der Herstellungs- und Rezepturparameter zu einer physikalisch und chemisch stabilen Emulsion führen. Zur Beurteilung wurden die Emulsionen mittels LD-, PCS- und Zetapotentialmessung charakterisiert und zusätzlich mittels Lichtmikroskopie geprüft. Hauptaugenmerk lag zudem auf der vergleichenden chemischen Stabilität des eingearbeiteten Arzneistoffs. Daher wurden die Emulsionen vor und nach einem Standardautoklavierprozess mittels HPLC-Analytik untersucht (vgl. Kap. 3.4.1.1).

Die Produktentwicklung sollte den Qualitätsansprüchen der Zulassungsbehörden entsprechen. Deswegen wurden die Sterilisation und die HPLC-Analytik unter industriellen Bedingungen zunächst extern durchgeführt.

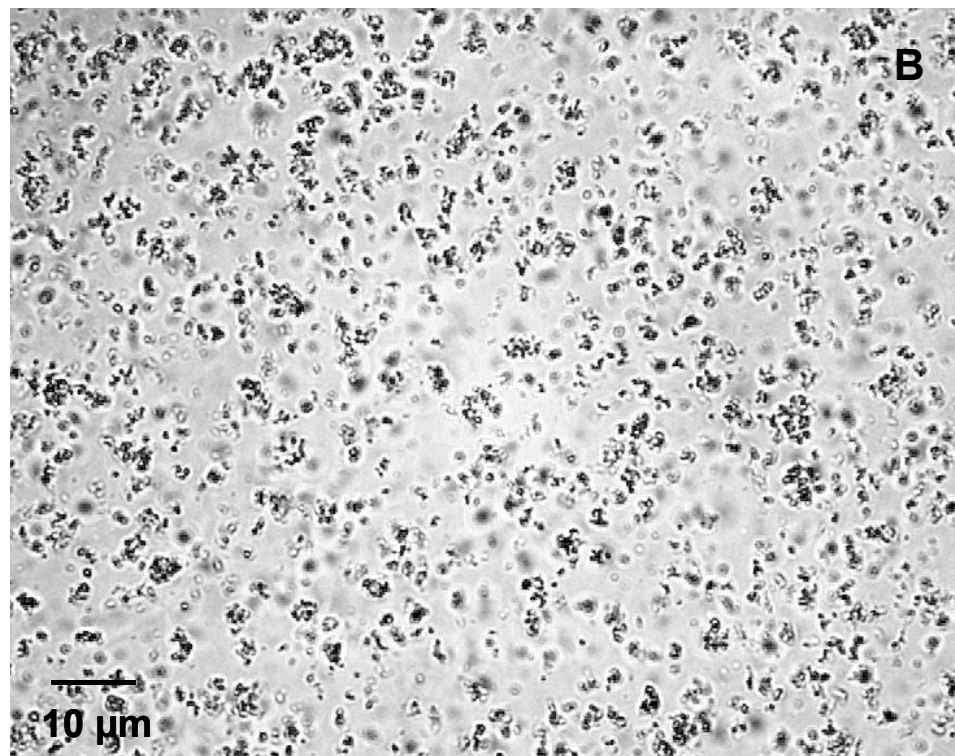
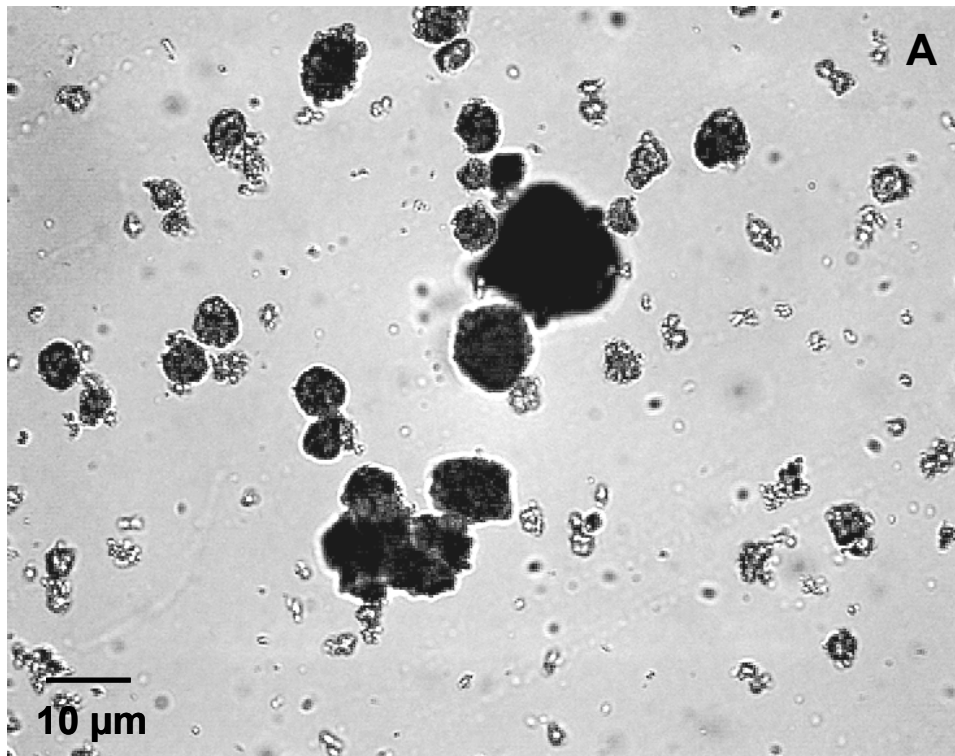
4.1.2 Charakterisierung der Ausgangssubstanzen

Zunächst wurden das Amphotericin B-Pulver und die Nanosuspension (vgl. 3.1.2) mittels Laserdiffraktometrie und, bei einem geeigneten Partikelgrößenbereich, mittels Photonenkorrelationsspektroskopie vermessen, um Auskunft über die Teilchengröße zu erhalten (nähere Einzelheiten in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2). Die Tabelle 4-1 zeigt einen Arzneistoff mit recht großen Partikeln, der unbehandelt für eine parenterale Anwendung ungeeignet ist.

Tab. 4-1: Vergleich der LD-Werte vom Amphotericin B-Pulver, vermessen in Tween® 80-Lösung, und der Nanosuspension

Partikelgröße	AmB-Pulver	AmB-Nanosuspension
LD d10% [μm]	0,25	0,449
LD d50% [μm]	8,1	2,105
LD d90% [μm]	15,8	3,109
LD d95% [μm]	19,6	3,348
LD d99% [μm]	27,6	3,768
LD d100% [μm]	39,8	4,656
PCS [nm]	-	2080
PI	-	0,457

Durch die Herstellung einer Nanosuspension konnte die Partikelgröße deutlich reduziert werden. Die Partikelgröße der Nanosuspension lag in der bekannten Größenordnung (Schmidt, 2002). Wie von Schmidt nachgewiesen wurde, lagen keine großen Kristalle im Mikrometerbereich vor. Es handelte sich auch hier lediglich um gelbliche lockere Agglomerate kleinerer Partikel, wie man an der Abbildung 4-1 erkennen kann. Dargestellt ist eine lichtmikroskopische Analyse der unverdünnten Nanosuspension (Abb. 4-1 B). Zum Vergleich wurde auch das Amphotericin B-Pulver mikroskopisch untersucht (Abb. 4-1 A). Neben kleineren Kristallbrüchen sind in der Abbildung 4-1 A große Arzneistoffstücke zu finden, bei denen es sich nicht um Agglomerate kleinerer Kristalle handelt. Das Pulver erscheint gelblich und weist eher eine rundliche Form der Kristalle auf.



**Abb. 4-1: A: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Amphotericin B-Pulver in Wasser
B: unverdünnte Nanosuspension (2,5% Amphotericin B, 2,4% Eilecithin, 1500 bar,
15 Zyklen). Beide Bilder wurden bei 630facher Vergrößerung aufgenommen.**

4.1.3 Einfluss des Lecithingehalts

Ziel des weiteren Rezepturscreening war eine verbesserte Einlagerung in die Lecithingrenzschicht. Dies sollte zu einer guten physikalischen und chemischen Stabilität der Emulsionen führen.

Parenteral anwendbare Rezepturen bedürfen einer kritischen Beurteilung der Inhaltsstoffe. Nur wenige Substanzen besitzen den GRAS-Status und können somit problemlos zu parenteralen Formulierungen verarbeitet werden. Einen Überblick über einsetzbare Substanzen und ihre Konzentration geben Powell et al. (1998). Weitere Anhaltspunkte geben Listen der regulierenden Behörden, wie z.B. die FDA und das BfArM, Arzneibücher und verschiedene wissenschaftliche Tabellen (z.B. CIBA-Geigy, 1975). Wegen des Ziels der parenteralen Anwendung kamen nur solche Ausgangsstoffe, die den GRAS-Status besitzen, infrage, um hinsichtlich einer späteren Zulassung Kosten zu sparen.

Amphotericin B ist ein hitze- und lichtempfindlicher Arzneistoff (Pyle, 1981; Sievers et al., 1996; Walker et al., 1998); s. auch Kap. 4.7). Die Autoklavierstabilität des Arzneistoffs ist besonders kritisch. Nachdem bei Schmidt die Zusammensetzung der Fettphase verändert und der Fettgehalt der Emulsionen von 20 auf 10% reduziert werden konnte, wurde nun untersucht, in wiefern Eilecithin für die Stabilisierung des Arzneistoffs verantwortlich ist. Es galt herauszufinden, ob es bei Erhöhung oder Reduzierung des Lecithingehalts zu einer Stabilitätssteigerung während der Sterilisation kommt.

Es wurden mit Amphotericin B beladene Emulsionen in der Größe von 1 mg/mL - wie unter 3.1.4.2 beschrieben - hergestellt. Eigens für diese Versuche auf der Basis von Lipofundin[®] MCT 10% hergestellte Emulsionen dienten als Ausgangsemulsion, wobei zur Erleichterung in dieser Arbeit auch die nicht handelsüblichen Fettemulsionen grundsätzlich als Lipofundin[®] bezeichnet werden. Zur Stabilisierung wurden Emulgatorkonzentrationen von 0,6; 0,8; 1,2 und 2,4% Eilecithin eingesetzt. Weiterhin wurde zum Vergleich eine Emulsion ohne Eilecithin, aber mit 1,2% Tween[®] 80, untersucht. Lecithine als ionogene Emulgatoren stabilisieren über ihre Ladung. Hingegen ist das nichtionogene Tween[®] 80 ein sterischer Stabilisator. Um die Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens zu überprüfen, wurden alle Versuche mit n = 2 durchgeführt, d.h. es wurden jeweils 2 Emulsionen hergestellt und untersucht.

Zunächst wurden die Emulsionen durch PCS- und LD-Messungen hinsichtlich ihrer Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung charakterisiert. Zusätzlich wurden die Ausgangs-

emulsionen untersucht, um auftretende physikalische Instabilitäten durch den Herstellungsprozess und den Zerkleinerungsgrad der Partikel zu beurteilen.

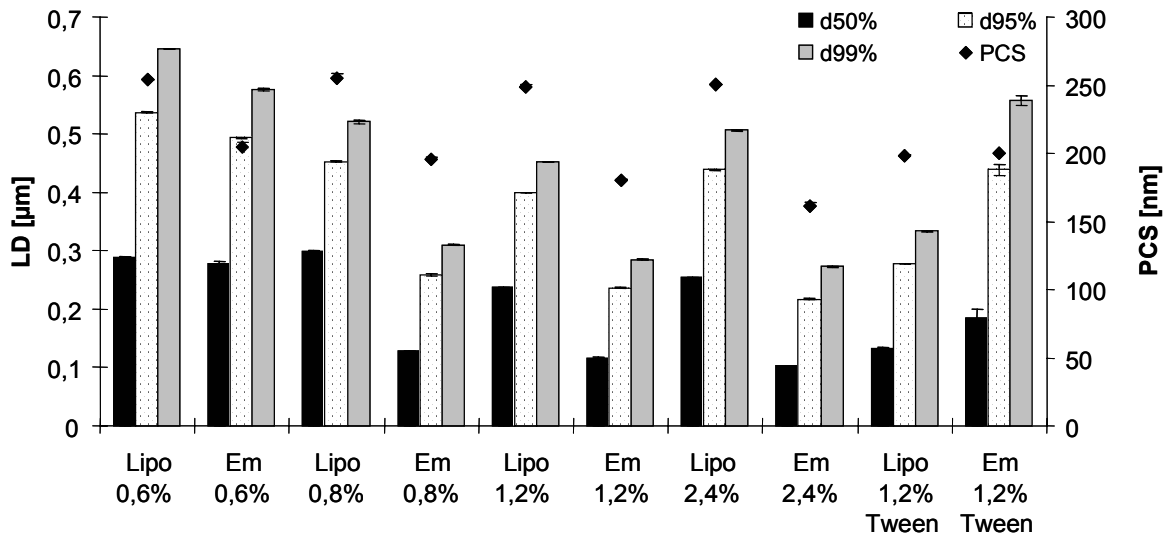


Abb. 4-2: LD- und PCS-Daten der Emulsionen mit unterschiedlichen Eilecithinkonzentrationen und Tween[®] 80; Lipo = Lipofundin[®] MCT 10% stabilisiert mit x % Eilecithin bzw. Tween[®] 80; Em = beladene Amphotericin B-Emulsion (600 bar, 45 °C, 10 Zyklen) mit entsprechendem % Emulgator; n = 2.

Die Abbildung 4-2 zeigt die Ergebnisse der Ausgangsemulsionen (Lipo) und Amphotericin B-haltigen Emulsionen (Em). Die homogenisierten Emulsionen konnten in ihrer Größe reduziert werden. Mit zunehmendem Lecithingehalt stieg der Dispersitätsgrad. Auch andere Autoren beschreiben eine zunehmende Reduktion der Partikelgröße bei steigendem Emulgatoranteil (Bock, 1994; Magdassi and Siman-Tov, 1990; Templin, 2003). Häufig ist es möglich, durch die Erhöhung des Emulgatoranteils oder durch die Wahl eines schneller an den Grenzflächen adsorbierenden Emulgators die Koaleszens der aufgebrochenen Tropfen zu verringern und somit kleinere Tropfen zu erhalten. Die kleinsten Partikel (PCS: 161 nm) mit einer engen Partikelgrößenverteilung (PI: 0,13) wurden durch eine Stabilisierung mit 2,4% Lecithin erreicht. Die beladenen Emulsionen mit 0,6% Lecithin unterschieden sich in der Größe kaum von der Ausgangsemulsion. Auffällig war eine leichte Größenzunahme der mit Amphotericin B beladenen Tween[®] 80-Emulsionen. Der Herstellungsprozess, sei es der Energieeintrag durch das Homogenisieren oder die Beladung mit Amphotericin B, hat einen Einfluss auf die Stabilität der neu geschaffenen Grenzflächen zwischen Öl und Wasser. Die

Partikelvergrößerung ist allerdings für eine parenterale Applikation bedeutungslos, da die Partikel deutlich unter 1 μm lagen.

Im mikroskopischen Bild waren unter polarisiertem Licht in der Emulsion keine Restkristalle sichtbar. Die Abbildung 4-3 zeigt beispielhaft eine mit 1 mg/mL beladene Amphotericin B-Emulsion, die mit 0,8% Eilecithin stabilisiert wurde. Sehr kleine Arzneistoffkristalle, die von anderen feinen Öltröpfchen im LD nicht zu unterscheiden sind, können mittels polarisierten Lichts sichtbar gemacht werden (vgl. Kap. 3.3). Zur Erleichterung ist die Aufnahme als Negativ dargestellt, so dass Kristalle bzw. lichtbrechende Strukturen schwarz erscheinen. Im Gegensatz zu einer Emulsion von Schmidt, in der statt einer Nanosuspension das Pulver direkt eingearbeitet wurde (Schmidt, 2002), waren keine Kristalle mehr zu detektieren. Amphotericin B wurde vollständig in die Lecithinschicht eingebettet bzw. so weit in der Partikelgröße zerkleinert, dass die Kristalle mit dem Mikroskop nicht mehr nachweisbar waren.

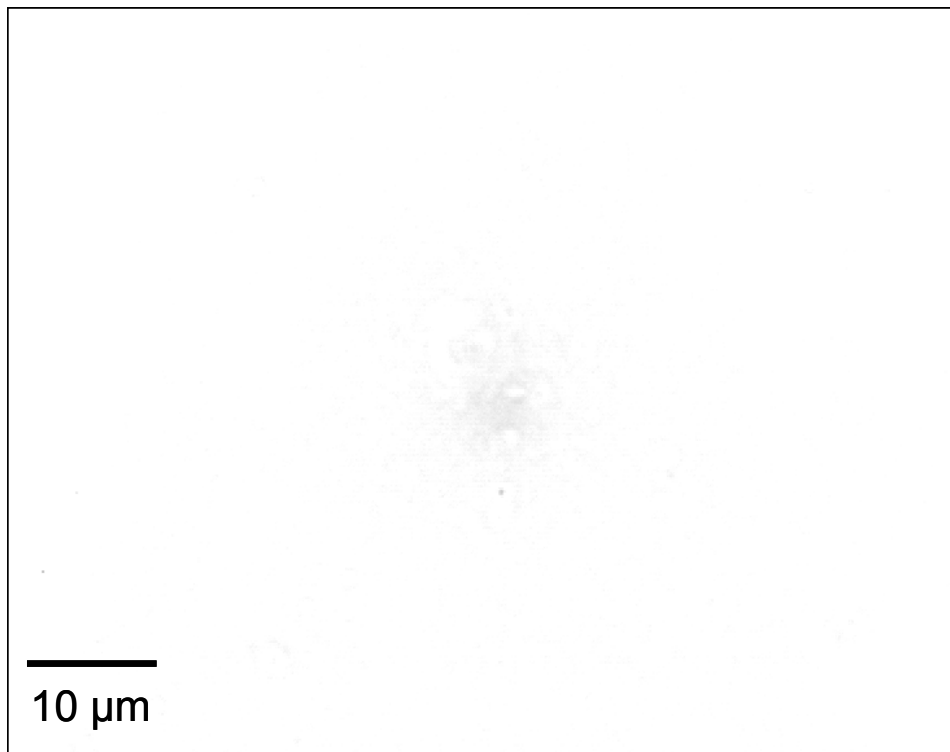


Abb. 4-3: **Negativaufnahme der unter polarisiertem Licht aufgenommenen beladenen Emulsion (0,8% Eilecithin, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, 1000fache Vergrößerung)**

Einen weiteren Anhaltspunkt für die Einlagerung und die Stabilität der Emulsionen sollte die Bestimmung des Zetapotentials in Leitfähigkeitswasser ($50 \mu\text{S}/\text{cm}$) und im Originaldispersionsmedium liefern. Die Vorgehensweise wurde in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Die Ergebnisse ergaben keinen eindeutigen Unterschied. Die Ausgangsemulsionen lagen im Bereich um -35 mV . Die beladenen Emulsionen mit Eilecithin zeigten ein sehr ähnliches Zetapotential. In Leitfähigkeitswasser (pH 6,0) lagen die Potentiale in einem Bereich von -25 (2,4% Lecithin) und -32 mV (1,2% Lecithin). Im Originalmedium lag das Potential erwartungsgemäß leicht höher bei -31 bis -35 mV . Eine Regelmäßigkeit in der Änderung der Potentiale durch Erhöhung der Lecithinkonzentration konnte nicht festgestellt werden. Ein ausreichendes Zetapotential war durch das Lecithin zu erwarten, da es die Oberflächenladung erhöht. Da für parenterale O/W-Emulsionen der übliche Zetapotentialbereich zwischen -30 mV und -60 mV liegt und diese Emulsionen über mehrere Jahre stabil gelagert werden können, ließen die produzierten Emulsionen eine ausreichende Stabilität vermuten. Das Zetapotential der beladenen Tween[®]-haltigen Emulsionen betrug $-17,0 \pm 0,6$ in Leitfähigkeitswasser und $-26,3 \pm 0,4 \text{ mV}$ im Originalmedium. Tween[®] 80 (Polysorbat 80) gehört zu den sterischen Stabilisatoren. Ein niedrigeres Zetapotential lässt daher trotzdem auf eine ausreichende Stabilität schließen.

Ein wichtiges Kriterium für die Entwicklung von Emulsionen mit Amphotericin B stellt die physikalische und chemische Stabilität während des Autoklavierungsprozesses dar. Zum einen dürfen die Emulsionen keine physikalische Instabilität während der Sterilisation zeigen, zum anderen stellt die Zersetzung des Arzneistoffes während der Hitzeeinwirkung ein Problem dar.

Die Proben wurden unter Standardbedingung extern autoklaviert ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min). Der Gehalt wurde vor und nach der Sterilisation mittels HPLC-Analytik bestimmt. Um die physikalische Stabilität der Emulsionen nach der Sterilisation beurteilen zu können, wurde vor Ort eine Charakterisierung mittels PCS und Mikroskopie durchgeführt. Mit der mikroskopischen Untersuchung sollten Partikel detektiert werden, die durch PCS nicht mehr erfasst werden. In Abbildung 4-4 sind die Ergebnisse der PCS-Untersuchungen vor und nach Sterilisation aufgetragen.

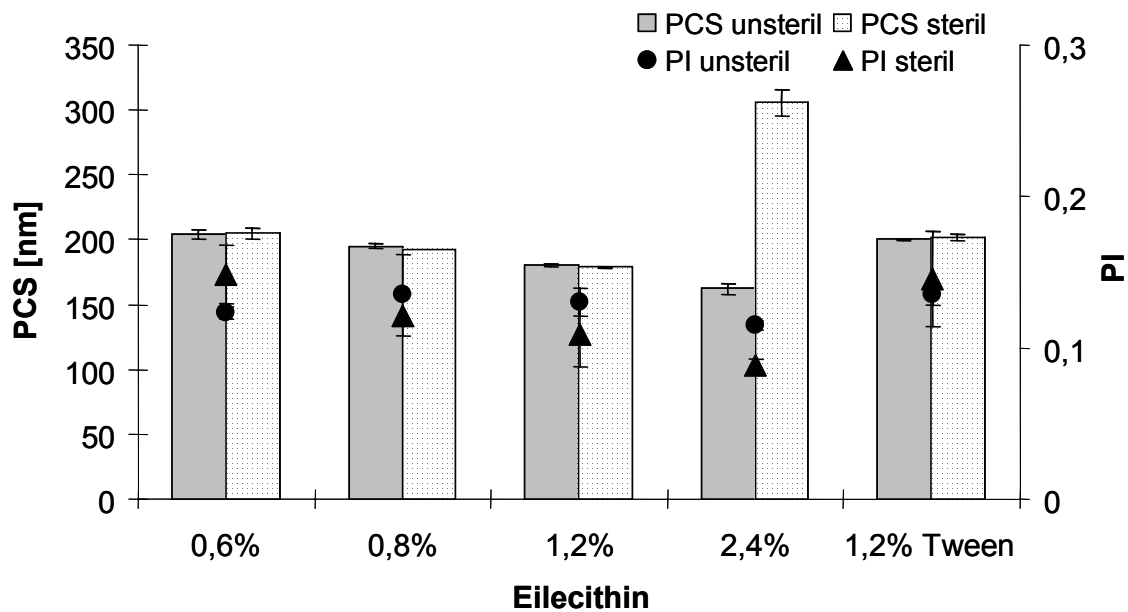


Abb. 4-4: Mittlere Partikelgröße (PCS) amphotericinbeladener Emulsionen (600 bar, 45 °C, 10 Zyklen) mit unterschiedlichem Lecithingehalt bzw. 1,2% Tween® 80 vor und nach Sterilisation; n = 2.

Der Autoklavierungsprozess beeinträchtigte kaum den physikalischen Zustand der Emulsionen. Lediglich bei dem höchsten Lecithingehalt wurde ein Partikelgrößenanstieg verzeichnet. Eine vermutete Instabilität der Emulsionen mit Tween® konnte hier widerlegt werden. Generell eigneten sich alle untersuchten Emulsionen für die i.v. Applikation. Lichtmikroskopische Aufnahmen (Beispiele vgl. Abb. 4-5a-e) zeigten, dass nach dem Sterilisationsprozess in den Emulsionen, die mit 0,6% Lecithin stabilisiert wurden, deutlich mehr Tropfen im Mikrometerbereich zu finden waren als vorher. Somit wird deutlich, dass die Mikroskopie in Ergänzung zur PCS-Untersuchung eine hilfreiche Methode darstellt. Einige Partikel im Mikrometerbereich, die neben der Hauptpopulation vorliegen oder dem Messbereich der PCS nicht mehr zugänglich sind, können aufgedeckt werden. Nach diesen Bildern zu urteilen, zeigte die mit 0,6% Lecithin stabilisierte Emulsion eine etwas geringere Autoklavierstabilität. Der Anteil an Partikeln über 3 µm stieg deutlich an. Die Emulsionen mit Tween® zeigten schon vor der Sterilisation einen größeren Anteil an Partikeln zwischen 1 und 2 µm. Bei den Abbildungen 4-5 C-H konnte kaum ein Unterschied zwischen den sterilen und unsterilen Proben aufgezeigt werden. Der Partikelgrößenzunahme der sterilisierten Chargen mit 2,4% Lecithin konnte mikroskopisch nicht bestätigt werden, vermutlich weil sie im submikroskopischen Bereich stattfand (Erhöhung von ca. 200 nm auf 300 nm).

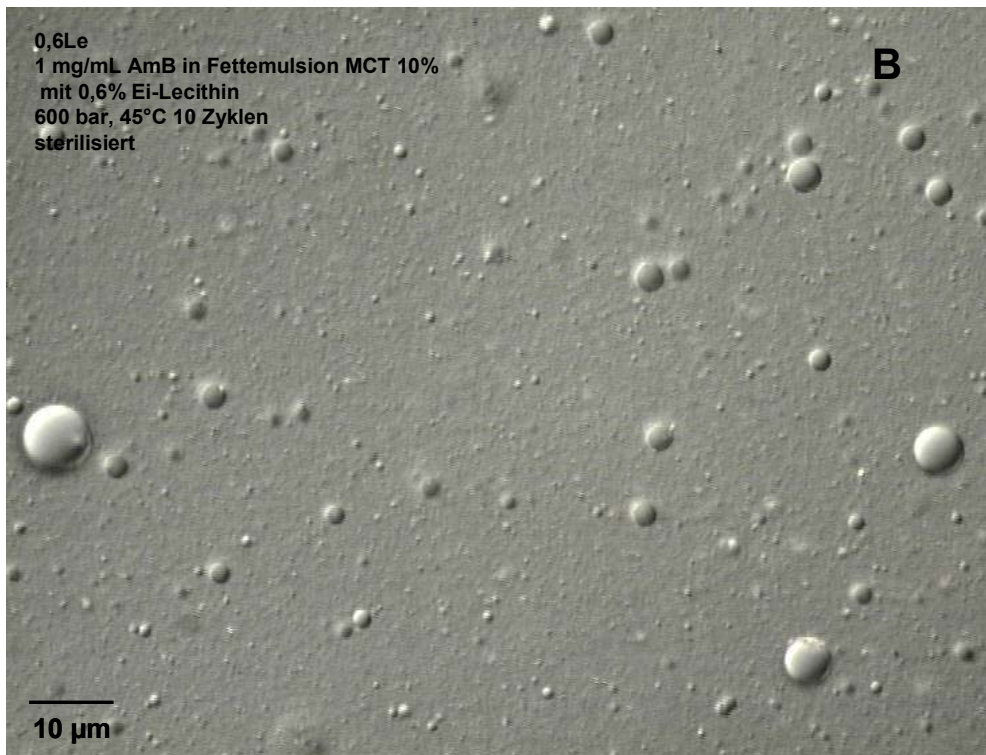
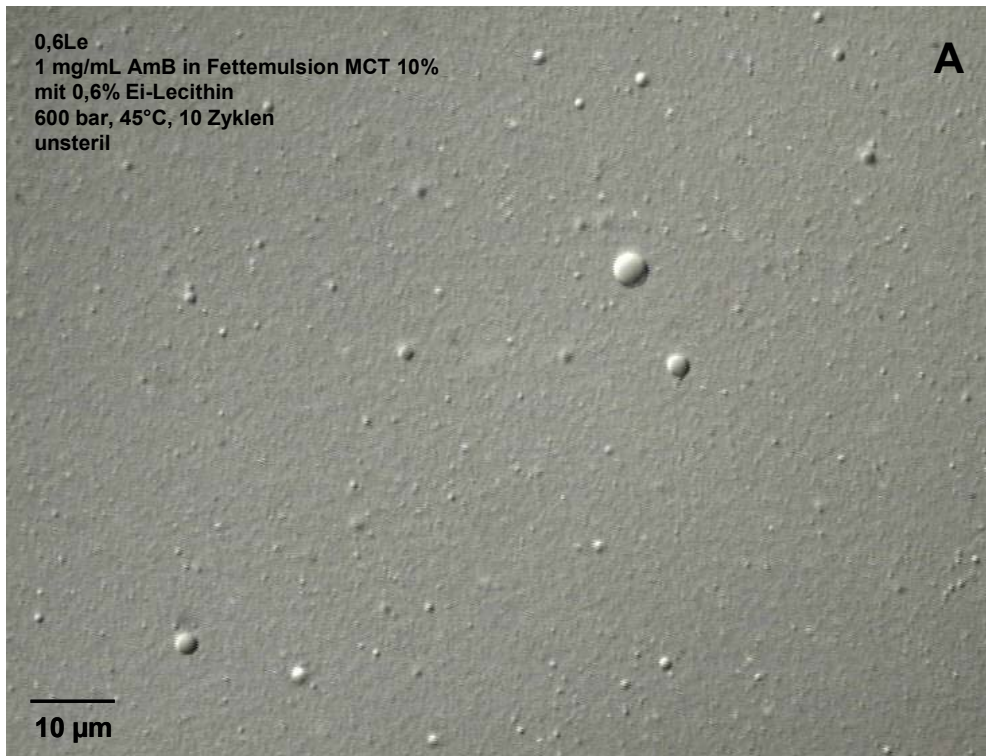


Abb. 4-5a: Lichtmikroskopische Aufnahmen von amphotericinbeladenen Emulsionen

A: 0,6% Eilecithin, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, unsteril

B: 0,6% Eilecithin, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, sterilisiert

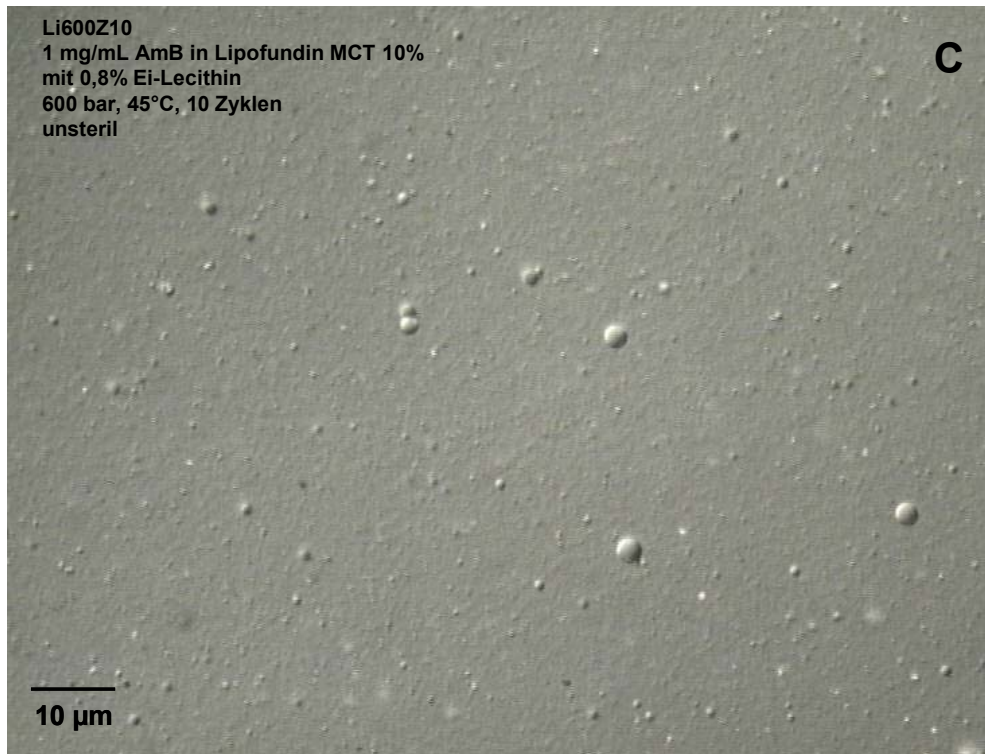


Abb. 4-5b: C: 0,8% Eilecithin, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, unsteril

D: 0,8% Eilecithin, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, sterilisiert



Abb. 4-5c: E: 1,2% Eilecithin, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, unsteril

F: 1,2% Eilecithin, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, sterilisiert

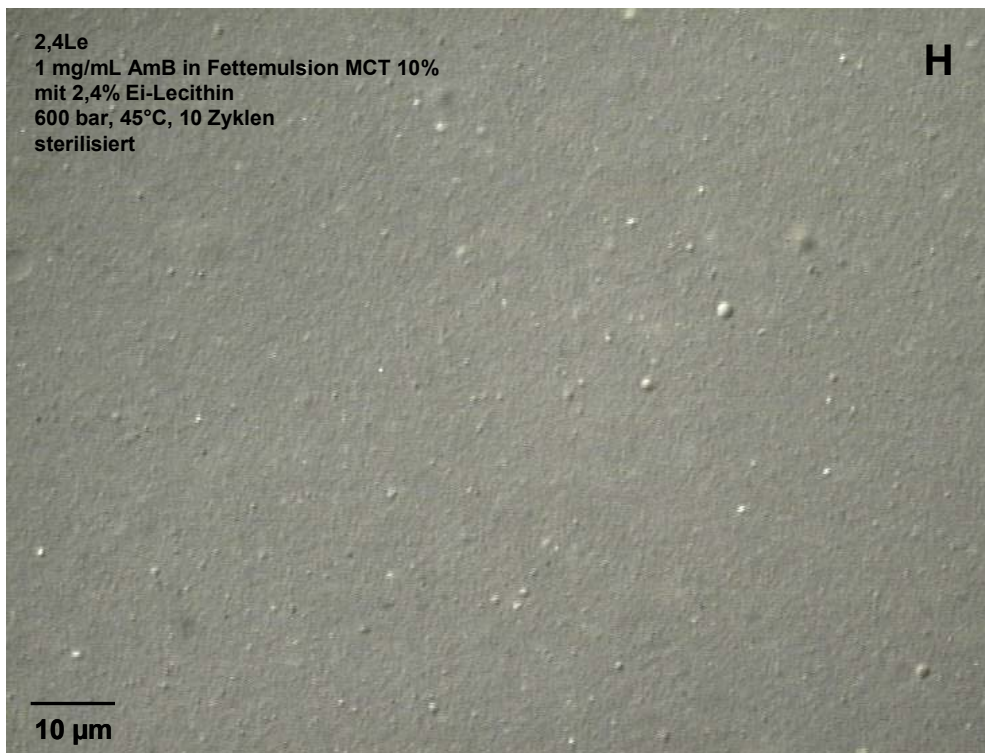


Abb. 4-5d: G: 2,4% Eilecithin, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, unsteril

H: 2,4% Eilecithin, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, sterilisiert



Abb. 4-5e: I: 1,2% Tween 80, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, unsteril

J: 1,2 Tween 80, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, sterilisiert

Während des Sterilisationsprozesses kommt es zum chemischen Abbau von Amphotericin B. Die Untersuchungen sollten zeigen, ob durch die Variation der Emulgatoren und deren Konzentration eine verbesserte Verkapselung in die Lecithingrenzschicht erlangt und damit die Autoklavierstabilität verbessert wird. Tabelle 4-2 zeigt den Gehalt an Amphotericin B nach dem Autoklavieren, der mittels HPLC bestimmt wurde (vgl. Kap. 3.4.1.1). Diese Untersuchungen wurden während des Rezepturscreenings extern durchgeführt. Der Gehalt vor der Sterilisation wurde gleich 100% gesetzt. Vor der Sterilisation wurden jeweils die 2 Chargen gepoolt.

Tab. 4-2: Prozentualer Amphotericin B-Gehalt der Emulsionen nach dem Autoklavieren

Emulsionen	Eilecithin				Tween [®] 80
	0,6%	0,8%	1,2%	2,4%	1,2%
steril	71,3%	97,9%	85,8%	78,9%	78,7%

Die Chargen mit 0,8% Eilecithin zeigten das beste Ergebnis mit einem Gehalt von 98%. Es bestätigte sich, dass ein Lecithingehalt von 0,6% keine ausreichende Stabilisierung ermöglicht. Die Lecithinmenge war zu gering, um sowohl die Öltropfen zu stabilisieren als auch ausreichend Schutz vor chemischer Zersetzung zu bieten. Diese Beobachtung wurde zusätzlich durch den niedrigen Amphotericin B-Gehalt vor der Sterilisation unterstützt. Die Emulsionen zeigten bei Ankunft im externen Labor einen Amphotericin B-Gehalt zwischen 0,8 und 1,0 mg/mL. Bei den 2 Emulsionen mit 0,6% Eilecithin hingegen wurde bei Ankunft (Tag 3) nur noch ein Gehalt zwischen 0,5 und 0,6 mg/mL Amphotericin B festgestellt.

Die bisherigen Untersuchungen, einbezogen die Ergebnisse von Schmidt, zeigen, dass ein Gehalt von 0,8% Eilecithin in den Emulsionen unter den Herstellungsbedingungen bezüglich physikalischer und chemischer Stabilität als optimal angesehen werden kann (Schmidt: Autoklavierstabilität von 89,2%). Der Schutz vor einer chemischen Zersetzung ist hier am besten. Die chemische Stabilität nimmt mit zunehmender oder abnehmender Lecithinkonzentration leicht ab. Für die weiteren Studien wurden die Amphotericin B-Emulsionen auf der Basis von Lipofundin[®] MCT 10% mit 0,8% Eilecithin hergestellt.

4.1.4 Zyklensoptimierung

4.1.4.1 Funktion der Zyklenzahl

Durch die moderaten Prozessbedingungen wurde schon weitgehend Rücksicht auf den thermisch labilen Arzneistoff genommen. Die folgenden Untersuchungen sollten die Effizienz der Verkapselung des Arzneistoffs unter dem Einfluss der Zyklenzahlen klären. Eine Reduzierung des eingebrachten Energieeintrags in das System führt normalerweise zu einer besseren physikalischen Langzeitstabilität. Sie könnte sich daher auch positiv auf die chemische Stabilität des Arzneistoffs auswirken.

Die mit 1 mg/mL Amphotericin B beladenen Emulsionen wurden mit variierender Anzahl der Homogenisationszyklen (= Z, Z: 1, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 und 20, n = 2; Z 10: n = 4) hergestellt. Die Ergebnisse der LD- und PCS-Messung sind in Abbildung 4-6 zusammengefasst.

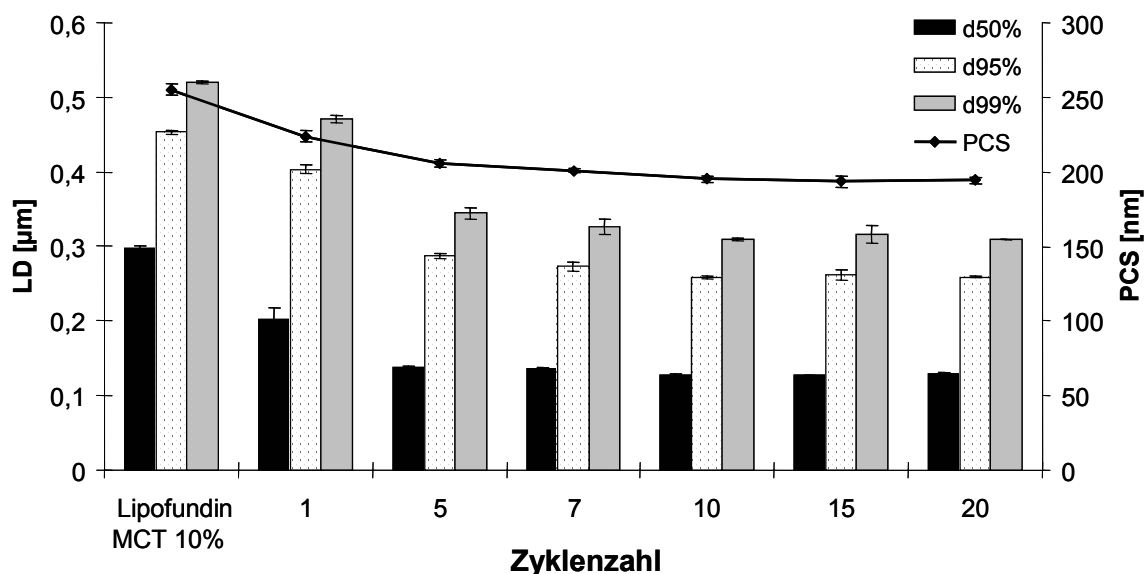


Abb. 4-6: LD- und PCS-Daten der Amphotericin B-haltigen Emulsionen nach Produktion mit unterschiedlichen Homogenisationszyklen (1 mg/mL Amphotericin B, 600 bar, 45 °C); im Vergleich sind die Werte der Ausgangsemulsion (Lipo MCT 10%) aufgeführt; n = 2 außer Z 10: n = 4.

Durch die Homogenisation wurde der Dispersitätsgrad von Lipofundin® MCT 10 % (d50%: 298 nm, d95%: 453 nm, d99%: 520 nm, PCS: 255 nm, PI: 0,124) weiter erhöht. Alle beladenen Emulsionen zeigten einen mittleren PCS-Durchmesser, der unter 220 nm lag. Ab Zyklus 8 (PCS: 195 nm, PI: 0,132) erfuhren die Öltröpfchen mit dem Arzneistoff keine

weitere Zerkleinerung. Die Emulsionen wurden lediglich geringfügig homogener. Dies wird deutlich am Abfall des bereits kleinen PIs von 0,15 nach Zyklus 1 (PCS: 224 nm) auf 0,11 nach Zyklus 20 (PCS: 194 nm). Nach Abschluss der Homogenisation (20 Zyklen) waren in den Emulsionen keine Partikel größer als 1 µm zu detektieren.

Nach 10 Zyklen war die Enddispersität erreicht, bei weiterer Homogenisation konnte keine weitere Zerkleinerung der Tröpfchen beobachtet werden.

Die Messung des Zetapotentials erfolgte in Leitfähigkeitswasser und im Originaldispersionsmedium. Das Zetapotential lag in beiden Medien (pH 6,0) in einem Bereich von -27 bis -34 mV. Die Anzahl der Zyklen während der Herstellung zeigte keinen Einfluss auf die Ladung der Emulsionen. Somit konnte anhand des Zetapotentials nicht abgeschätzt werden, ob eine unvollständige oder vollständige Einlagerung von Amphotericin B in die Monolayer zwischen Öl und Wasser vorlag.

Als Entscheidungskriterium der anzuwendenden Zyklenzahl für die weiteren Studien wurden die Ergebnisse nach der Sterilisation herangezogen (vgl. Abb. 4.7).

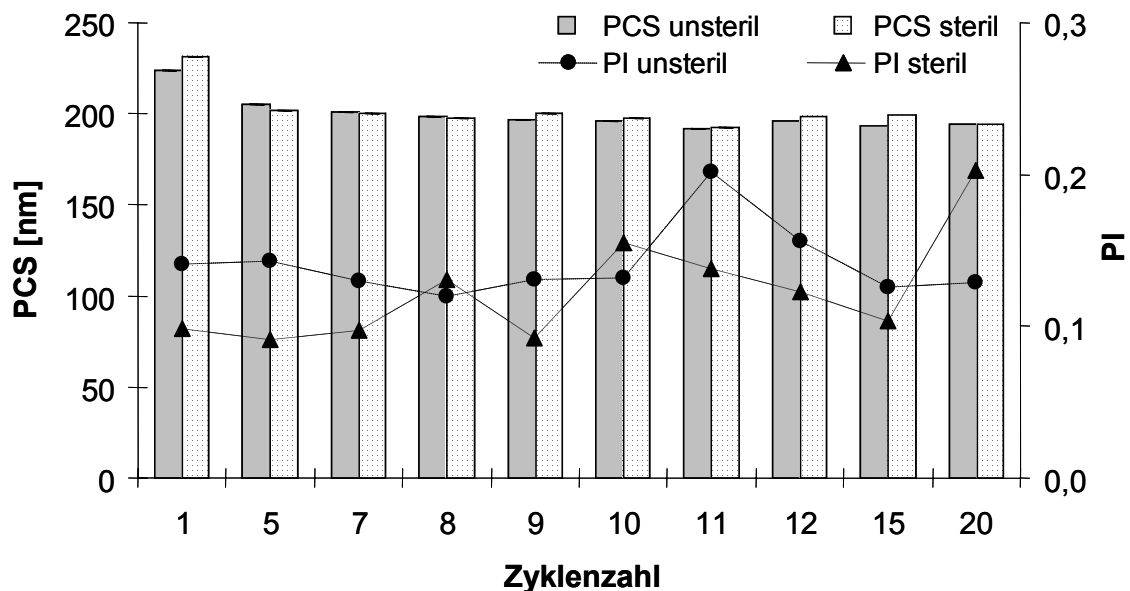


Abb. 4-7: Vergleich der PCS-Daten der amphotericinbeladenen Emulsionen nach Herstellung mit Zyklenzahlen von 1 bis 20 vor und nach der Dampfdrucksterilisation

Nach der Sterilisation zeigten die Partikeldurchmesser wenig Veränderung. Es konnte keine physikalische Instabilität beobachtet werden. Zyklenabhängig waren keine Unterschiede zwischen 5 und 20 Zyklen festzustellen. Selbst die Charge mit nur einem Homogenisationszyklus, bei der eine komplette Einarbeitung des Arzneistoffs eher unwahrscheinlich erscheint und durch freies Amphotericin B eine physikalische Instabilität zu erwarten war, zeigte nur eine geringfügige Vergrößerung des mittleren PCS-Durchmessers um 30 nm. Die Polydispersitätsindices nach dem Autoklavieren lagen im bekannten Bereich zwischen 0,09 und 0,20. Diese Ergebnisse wurden durch Lichtmikroskopaufnahmen bestätigt. Beispielhaft sind Aufnahmen von Zyklus 1, 10 und 20 aufgeführt. Größere Emulsionstropfen sind in den Aufnahmen nicht zu erkennen (Abb. 4-8a-c).

Die Zyklenzahl zeigte keinen nennenswerten Einfluss auf die Partikelgröße vor und nach der Autoklavierung. Der mögliche Einfluss auf die chemische Stabilität von Amphotericin B nach dem Autoklavieren wurde durch eine Gehaltsbestimmung mittels HPLC untersucht, um somit einen Rückschluss auf eine variierende Einlagerung in die Lecithinschicht zu ziehen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-9 dargestellt. Die Chargen Z1, Z5, Z7, Z15 und Z20 wurden vor der Sterilisation gepoolt.

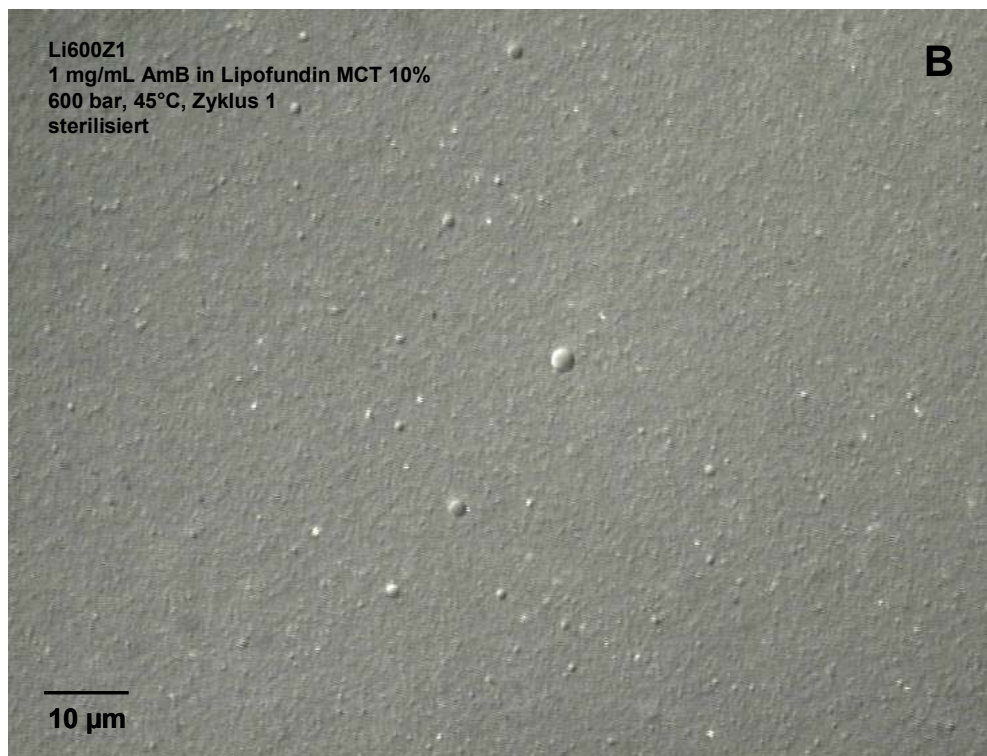
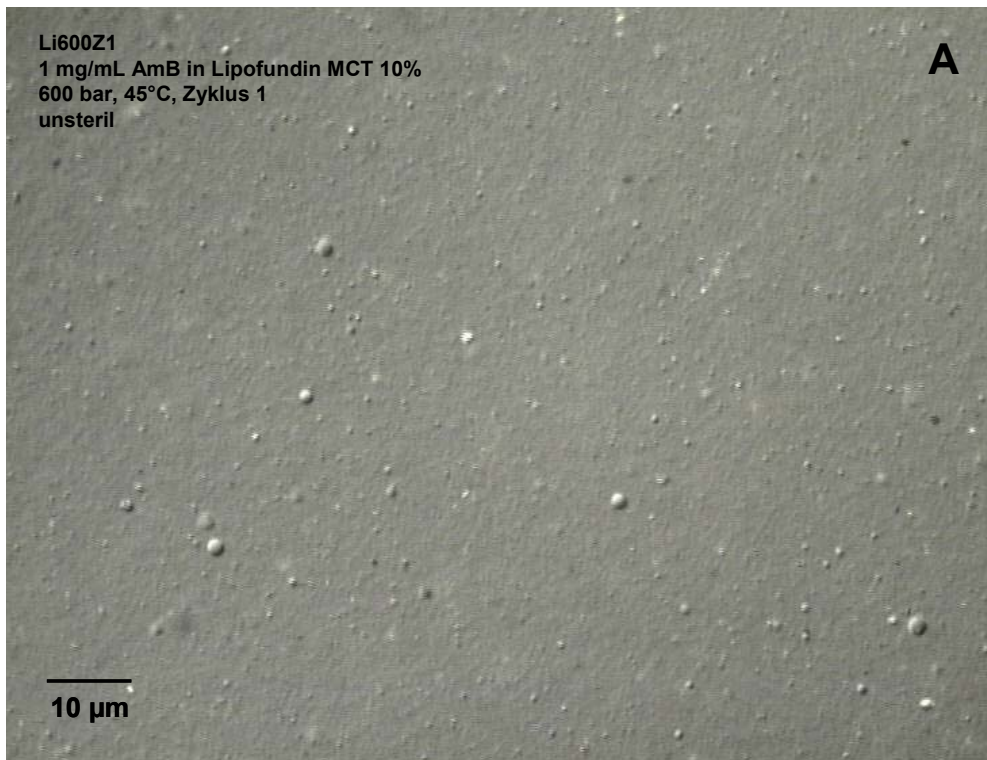


Abb. 4-8a: Lichtmikroskopische Aufnahmen von amphotericinbeladenen Emulsionen

A: Zyklus 1, 600 bar, 45 °C, unsteril

B: Zyklus 1, 600 bar, 45 °C, sterilisiert

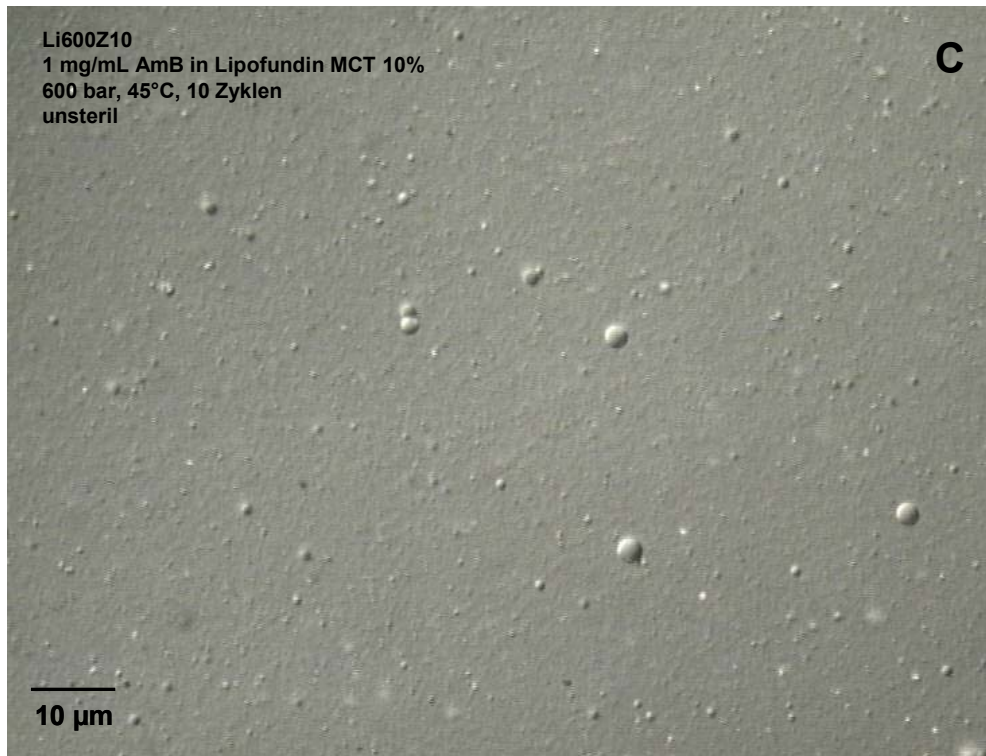


Abb. 4-8b: C: Zyklus 10, 600 bar, 45 °C, unsteril

D: Zyklus 10, 600 bar, 45 °C, sterilisiert

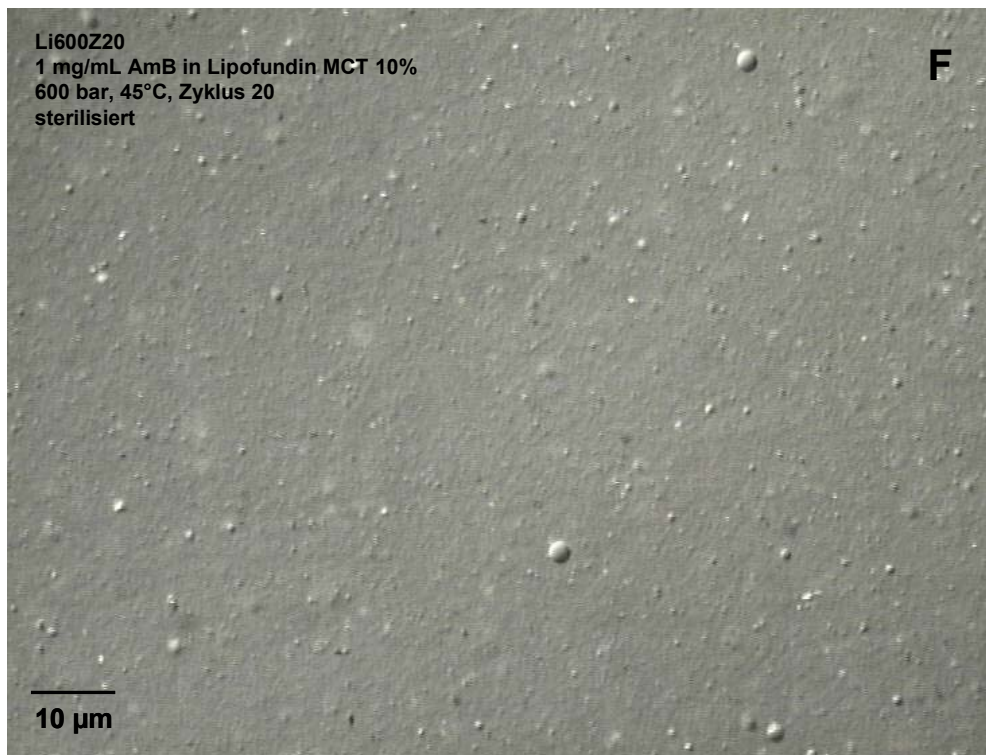


Abb. 4-8c: E: 20 Zyklen, 600 bar, 45 °C, unsteril
F: 20 Zyklen, 600 bar, 45 °C, sterilisiert

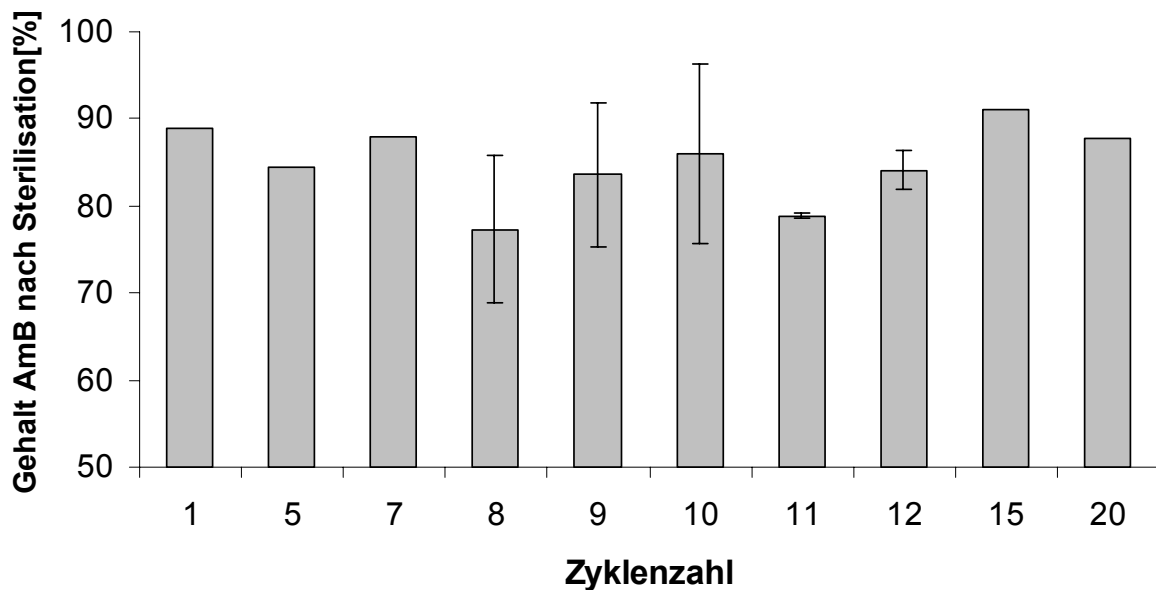


Abb. 4-9: Gehaltsbestimmung von Amphotericin B in Abhängigkeit von der Zyklenzahl; der Gehalt vor Sterilisation wurde gleich 100% gesetzt; die Chargen der Zyklen 1, 5, 7, 15 und 20 wurden vor den Untersuchungen gepoolt (Z 8 u. 9 n = 2, außer Z 10: n = 4).

Der Amphotericin B-Gehalt nach der Sterilisation lag zwischen 77 und 91%. Es war weder eindeutig erkennbar, welcher Zyklus die beste Autoklavierstabilität des Arzneistoffs liefert, noch, ob eine höhere oder niedrigere Zyklenzahl vorteilhaft ist. Andere Studien ließen vermuten, dass ein Zyklusoptimum um den Zyklus 10 liegt. Diese Beobachtung konnte nicht eindeutig bestätigt werden, da auch dieselbe Zyklenzahl bei identischer Rezeptur erheblich unterschiedliche Ergebnisse lieferte (Ergebnisse der einzelnen Chargen Z. 10: 79-98%). Schmidt konnte ebenfalls anhand einer anderen Rezeptur und anderen Herstellungsbedingungen keine höhere Autoklavierstabilität mit einer höheren Zyklenzahl feststellen (15 versus 10 Zyklen). Daher kann als Ergebnis festgehalten werden, dass eine Anzahl von mehr als 10 Zyklen nicht notwendig ist, um den Arzneistoff in die stabilisierende Lecithinschicht der Emulsion einzuarbeiten. Das erlangte Ergebnis von bis zu 98% zeigt, dass ein guter Schutz vor Zersetzung erreicht werden kann. Unbefriedigend ist hingegen die schwankende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Zum weiteren Vergleich wurde in den nächsten Untersuchungen mit einer Zyklenzahl von 10 weitergearbeitet.

4.1.4.2 De-Novo-Herstellung

Bisher wurde der Arzneistoff in eine vorher gefertigte parenterale Emulsion (Lipofundin[®]) eingearbeitet. Der Energieeintrag in die Emulsionen kann weiter reduziert werden, indem die Arzneistoffsuspension während der de-Novo-Herstellung des Lipofundin[®]s in die wässrige Phase einarbeitet und die Emulsion dann wie üblich industriell hergestellt wird. Somit kann der Energieeintrag in die Emulsionen weiter reduziert werden. Durch das mildere Herstellungsverfahren könnte eine bessere Autoklavierstabilität erzielt und zusätzlich die physikalische und chemische Langzeitstabilität positiv beeinflusst werden. Zum Vergleich wurden extern Amphotericin B-Emulsionen analog Lipofundin[®] MCT 10% mit einem Eilecithingehalt von 0,8 und 1,2% gefertigt. Zum Einsatz kam dort ein Microfluidizer[®]. Um nur einen Parameter zu variieren, wurde die Fettkonzentration konstant gehalten. Natriumoleat, Eilecithin, Glycerol und die Nanosuspension wurden hierzu mit Wasser 10 min lang einem Ultra-Turrax ausgesetzt. Anschließend wurde das Öl hinzugegeben und erneut 20 min lang mit einem Ultra-Turrax dispergiert. Vor der Flaschenabfüllung folgten im Microfluidizer[®] 5 Durchgänge bei ca. 500 bar.

Nach der Herstellung waren die Partikelgrößen der Emulsionen geringfügig größer als die mit dem LAB 40 hergestellten Emulsionen. Dies hatte keine physiologische Relevanz. Die Emulsionen mit 0,8% Lecithin zeigten einen d50% von 206 nm, der d95% lag bei 393 nm, der d99% bei 450 nm und der PCS-Durchmesser bei 224 nm mit einem PI von 0,109 (Vergleich Werte der LAB 40 hergestellten Emulsionen (10 Zyklen): d50% 131 nm, d95% 267 nm, d99% 322 nm, PCS 194 nm, PI: 0,147).

Auch bei der Herstellung mit einem Microfluidizer[®] war zu beobachten, dass mit zunehmendem Lecithingehalt der Zerkleinerungsgrad geringfügig zunahm (Abb. 4-10). Der Größenunterschied der mit den unterschiedlichen Homogenisatoren hergestellten Emulsionen resultierte aus den unterschiedlichen Charakteristika der Maschinen, dem Micron LAB 40, einem Kolben-Spalt-Homogenisator und dem Microfluidizer[®], einer Strömungsdispergiermaschine auf dem jet-Prinzip. Der Microfluidizer[®] weist einen Arbeitsdruck von 300-700 bar auf. Bei der Hochgeschwindigkeitshomogenisation mit dem Microfluidizer[®] wird die zur Zerteilung der inneren Phase notwendige Energie durch eine Pumpe erzeugt und als Strömungsenergie übertragen. In einer Interaktionskammer werden die Emulsionsströme geteilt und in einem 180° Winkel wieder aufeinander zugeleitet. Die Teilchenzerkleinerung findet durch Prall- und Scherkräfte statt (Müller and Böhm, 2001). Beim Micron Lab 40 hingegen (Arbeitsdruck von 300-1500 bar) ist der entscheidende Schritt hauptsächlich die Kavitation (Jahnke, 1998) bzw. die Bildung der Gasblasen zu Beginn der Kavitation, die zu

einer noch weiteren Verengung im Spalt sorgt und die Partikel (Tropfen oder Feststoffpartikel) zerreibt (vgl. Kap. 3.1.1).

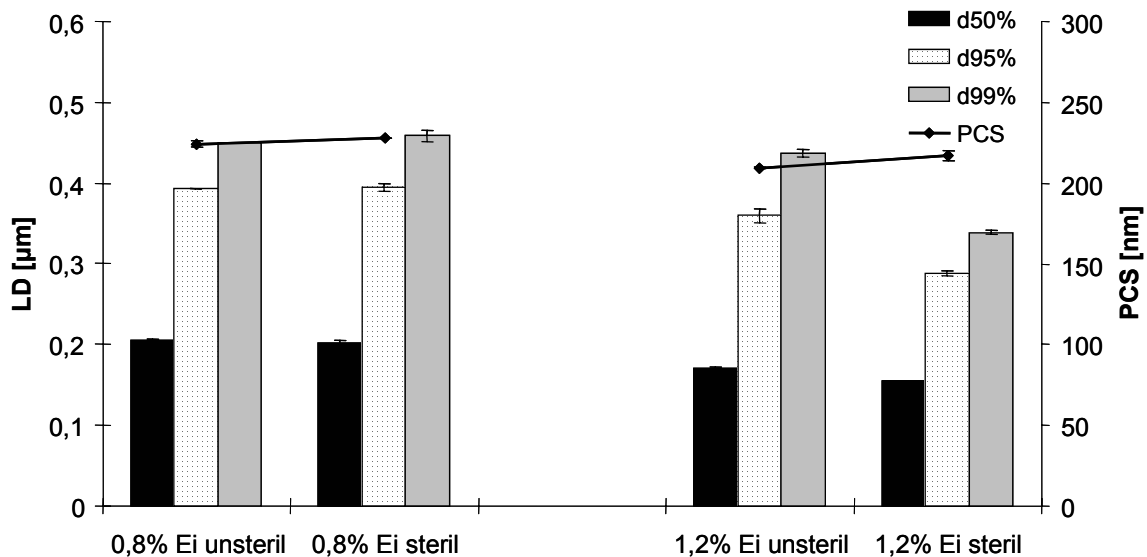


Abb. 4-10: LD- und PCS- Daten der de-Novo-Emulsionen mit 0,8% und 1,2% Eilecithin, unsteril und steril; die Zugabe der Amphotericin B Suspension erfolgte während der Emulsionsherstellung.

Die Emulsionen waren nach Sterilisation ebenfalls physikalisch stabil. Allerdings waren die LD-Werte bei den Emulsionen mit 1,2% Lecithin nach Sterilisation etwas kleiner. Der d50% und d99% wurden um 20 bzw. 100 nm kleiner, und der PCS-Durchmesser nahm um 10 nm leicht zu. Ein möglicher Grund für die Differenz in den LD-Werten kann das Entstehen von einigen größeren Öltröpfchen sein, die durch die Volumenauswertung im LD nicht mehr erfasst wurden und die die leichte Zunahme der Intensitätsverteilung (PCS) erklären. Die Mikroskopaufnahmen zeigten allerdings keine Auffälligkeiten, so dass von einer physikalischen Stabilität ausgegangen werden konnte.

Das Ziel der Studie war es, herauszufinden, ob durch eine Einarbeitung der Nanosuspension in die Wasserphase mit anschließender Emulsionsherstellung eine bessere Autoklavierstabilität erreicht werden kann. Mit 81,2 und 86,5% Amphotericin B lagen die Werte für 0,8 und 1,2% Eilecithin in der bekannten Größenordnung. Der Vergleich mit den vorherigen Studien zeigte keinen Vor- oder Nachteil dieses Herstellungsverfahrens. Daher wurde weiterhin die Nanosuspension in die parenterale Ausgangsemulsion eingearbeitet.

4.1.5 Glycerol-modifizierte Nanosuspensionen

4.1.5.1 Entwicklung einer Glycerol-modifizierten Nanosuspension

Durch Vorversuche konnte beobachtet werden, dass ein Glycerolzusatz zu einer Nanosuspension den Flockungsgrad minimiert. Bisher lag die Nanosuspension in Agglomeraten kleinerer Teilchen vor. Durch eine Behandlung im Ultraschallbad (Schmidt, 2002) oder durch erneute Homogenisation werden die lockeren Agglomerate jedoch wieder zerstört. Wenn der Schritt der Zerstörung der Agglomerate entfallen könnte, würde die eingetragene Energie vom Beginn des Dispergiervorgangs zum Lösen des Amphotericin B zur Verfügung stehen. Die Amphotericin B-Teilchen könnten dann schneller zur Lecithin-Ölschicht diffundieren und vollständig in die Lecithinschicht inkorporiert werden.

Durch diese Überlegung stellten sich folgende Fragen:

1. Welcher Glycerolzusatz ist für eine Nanosuspensionsrezeptur optimal?
2. Hat der Flockungsgrad der Nanosuspension einen Einfluss auf die Einlagerung in die Lecithinschicht?

In Abwandlung zum Kapitel 3.1.2 erfolgte die Herstellung der Amphotericin B -Suspensionen mit 20 Homogenisationszyklen. Die wässrige Phase wurde in 20%igen Schritten mit wasserfreiem Glycerol versetzt (100:0; 80:20; 60:40, 40:60, 20:80 und 0:100).

Zur Charakterisierung des Herstellungsverlaufs wurden Proben nach Zyklus, 1, 5, 10, 15 und 20 entnommen und mittels PCS-, LD- und Zetapotentialmessung bestimmt. Zusätzlich wurden Lichtmikroskopieaufnahmen (Z 20) an Tag 0 und 7 und nach 4 Wochen aufgenommen. Im Folgenden sind die erhaltenen Werte tabellarisch aufgelistet (Tab. 4-3).

Tab 4-3: Nanosuspensionen mit unterschiedlichem Glycerolgehalt (Lagerzeit 4 Wochen)**Tab. 4-3a: Nanosuspensionen mit einem Glycerolgehalt von 0-40% (Zyklen 1-20)**

Glycerol	Messparameter		Z1	Z5	Z10	Z15	Z20
0%	Tag 0	d50% [μm]	1,88	1,94	1,97	1,94	1,97
		d99% [μm]	3,65	3,65	3,68	3,69	3,70
		PCS \varnothing [nm]	2015	2745	1953	1832	1867
		PI	0,532	0,512	0,429	0,430	0,525
		ZP [mV]	-12,9	-7,4	-8,2	-11,3	-8,4
	Woche 1	d50% [μm]	1,90	1,77	1,86	0,73	2,19
		d99% [μm]	5,17	4,71	3,99	3,07	5,44
		PCS \varnothing [nm]	3076	3877	3239	2242	1910
		PI	0,540	0,532	0,544	0,585	0,369
		ZP [mV]	-8,8	-6,3	-6,3	-7,4	-7,6
	Woche 4	d50% [μm]	-	1,37	0,86	0,66	1,84
		d99% [μm]	-	3,36	2,55	2,16	2,91
		PCS \varnothing [nm]	-	1784	1517	1654	1385
		PI	-	0,413	0,372	0,459	0,378
		ZP [mV]	-	-19,7	-20,2	-17,9	-17,2
Glycerol	Messparameter		Z1	Z5	Z10	Z15	Z20
20%	Tag 0	d50% [μm]	1,70	1,79	1,77	1,93	1,84
		d99% [μm]	3,56	3,60	3,61	3,66	3,64
		PCS \varnothing [nm]	1536	2083	1720	1872	1340
		PI	0,577	0,525	0,434	0,475	0,360
		ZP [mV]	-5,5	-4,7	-4,8	-4,0	-3,8
	Woche 1	d50% [μm]	1,99	1,75	1,79	1,91	1,77
		d99% [μm]	6,66	3,51	3,52	3,64	3,53
		PCS \varnothing [nm]	1448	1381	2074	1752	1420
		PI	0,477	0,417	0,445	0,160	0,316
		ZP [mV]	-7,4	-6,8	-4,8	-6,3	-4,4
	Woche 4	d50% [μm]	1,51	0,79	0,78	1,59	1,52
		d99% [μm]	3,47	2,52	2,51	3,48	3,47
		PCS \varnothing [nm]	1554	1437	1713	1696	1294
		PI	0,446	0,394	0,363	0,376	0,260
		ZP [mV]	-17,8	-16,1	-18,5	-22,2	-8,9
Glycerol	Messparameter		Z1	Z5	Z10	Z15	Z20
40%	Tag 0	d50% [μm]	1,72	1,66	1,74	1,67	1,61
		d99% [μm]	3,56	3,48	3,51	3,47	3,50
		PCS \varnothing [nm]	1638	1093	1365	1327	1034
		PI	0,583	0,400	0,492	0,363	0,326
		ZP [mV]	2,5	2,8	3,4	2,3	2,8
	Woche 1	d50% [μm]	1,89	1,60	1,69	1,47	0,88
		d99% [μm]	4,95	3,44	3,49	3,42	2,49
		PCS \varnothing [nm]	1670	1598	1492	1310	1023
		PI	0,471	0,443	0,453	0,412	0,300
		ZP [mV]	-1,8	0,7	3,2	5,4	6,2
	Woche 4	d50% [μm]	1,66	1,38	0,92	0,81	0,79
		d99% [μm]	3,59	3,40	2,51	3,36	2,51
		PCS \varnothing [nm]	1721	1334	1563	1415	1133
		PI	0,387	0,373	0,417	0,388	0,214
		ZP [mV]	-0,9	0,2	-0,1	-3,0	1,5

Tab. 4-3b: Nanosuspensionen mit einem Glycerolgehalt von 60-100% (Zyklen 1-20)

Glycerol	Messparameter	Z1	Z5	Z10	Z15	Z20	
60%	Tag 0	d50% [μm]	0,97	0,76	0,86	0,63	0,61
		d99% [μm]	2,39	2,51	1,41	2,40	2,39
		PCS \emptyset [nm]	748	689	745	613	673
		PI	0,366	0,294	0,326	0,299	0,266
		ZP [mV]	26,4	25,2	28,2	27,1	26,7
	Woche 1	d50% [μm]	1,08	0,81	0,74	0,64	0,60
		d99% [μm]	3,43	3,26	2,74	2,39	2,48
		PCS \emptyset [nm]	1083	982	1019	921	766
		PI	0,383	0,296	0,320	0,266	0,253
		ZP [mV]	19,5	20,6	19,7	18,6	16,2
	Woche 4	d50% [μm]	1,08	0,84	0,73	0,61	0,62
		d99% [μm]	3,46	3,35	2,77	2,40	3,18
		PCS \emptyset [nm]	1100	969	954	912	725
		PI	0,355	0,272	0,252	0,263	0,137
		ZP [mV]	13,2	18,0	16,4	12,5	13,9
Glycerol	Messparameter	Z1	Z5	Z10	Z15	Z20	
80%	Tag 0	d50% [μm]	5,40	0,75	0,63	0,59	0,52
		d99% [μm]	12,79	3,41	3,01	2,67	2,80
		PCS \emptyset [nm]	518	529	502	471	489
		PI	0,381	0,245	0,210	0,149	0,220
		ZP [mV]	2,9	5,3	2,3	2,6	3,6
	Woche 1	d50% [μm]	0,75	0,76	0,68	0,61	0,57
		d99% [μm]	3,27	3,33	3,08	2,66	2,65
		PCS \emptyset [nm]	955	736	652	657	568
		PI	0,489	0,254	0,210	0,212	0,278
		ZP [mV]	4,9	12,3	6,1	4,4	4,0
	Woche 4	d50% [μm]	0,70	0,82	0,60	0,61	0,55
		d99% [μm]	2,51	3,47	2,53	2,99	2,84
		PCS \emptyset [nm]	830	705	703	776	571
		PI	0,376	0,194	0,207	0,184	0,131
		ZP [mV]	4,5	4,3	4,9	5,4	3,2
Glycerol	Messparameter	Z1	Z5	Z10	Z15	Z20	
100%	Tag 0	d50% [μm]	9,35	6,29	5,14	3,92	3,31
		d99% [μm]	68,0	21,9	23,4	10,5	10,3
		PCS \emptyset [nm]	1187	620	480	384	380
		PI	0,662	0,500	0,446	0,341	0,338
		ZP [mV]	-	-	-	-	-
	Woche 1	d50% [μm]	7,09	6,24	5,05	0,77	0,69
		d99% [μm]	16,9	15,2	12,6	2,59	2,59
		PCS \emptyset [nm]	2502	1553	817	819	534
		PI	0,637	0,532	0,496	0,212	0,347
		ZP [mV]	-	-	-	-	-
	Woche 4	d50% [μm]	6,73	5,61	2,53	1,89	1,94
		d99% [μm]	18,8	19,3	5,05	3,70	3,66
		PCS \emptyset [nm]	2698	1749	937	761	555
		PI	0,640	0,553	0,485	0,414	0,316
		ZP [mV]	-	-	-	-	-

Erfahrungsgemäß wird die Homogenisation im wässrigen Milieu durchgeführt, da die Kavitation primär für die Partikelzerkleinerung verantwortlich gemacht wird. In dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass auch eine Hochdruckhomogenisation in Dispersionsmedien mit sehr geringem Dampfdruck erfolgreich durchgeführt werden kann. Müller (2000) konnte bereits zeigen, dass sich für die Anwendung zu vernachlässigende Unterschiede ergeben, ob in wasserfreien (z.B. Öl), wasserreduzierten (Glycerol-Wasser-Mischungen) oder komplett wässrigen Medien homogenisiert wird. Die mittlere Größe der Hauptpopulation ist abhängig vom angewendeten Druck, der Anzahl der Homogenisationszyklen, der Härte der Kristalle und der Viskosität (Jahnke, 1998; Müller and Böhm, 1998). Mit zunehmender Zyklanzahl und zunehmendem Glycerolgehalt nahm die gemessene Partikelgröße ab. Allgemein konnte ab Zyklus 10-15 keine weitere Reduzierung der Partikelgröße erzielt werden, mit Ausnahme der Suspensionen mit einem Glycerolgehalt von 20 und 40%. Somit wurde mit 15 Zyklen maximale Dispersion erreicht. Durch den danach zusätzlich eingebrachten Energieeintrag stieg die mittlere Partikelgröße z.T. wieder an. Die Abbildung 4-11 verdeutlicht graphisch die Reduzierung der Partikelgröße der Suspensionen nach 20 Homogenisationszyklen mit steigender Glycerolmenge.

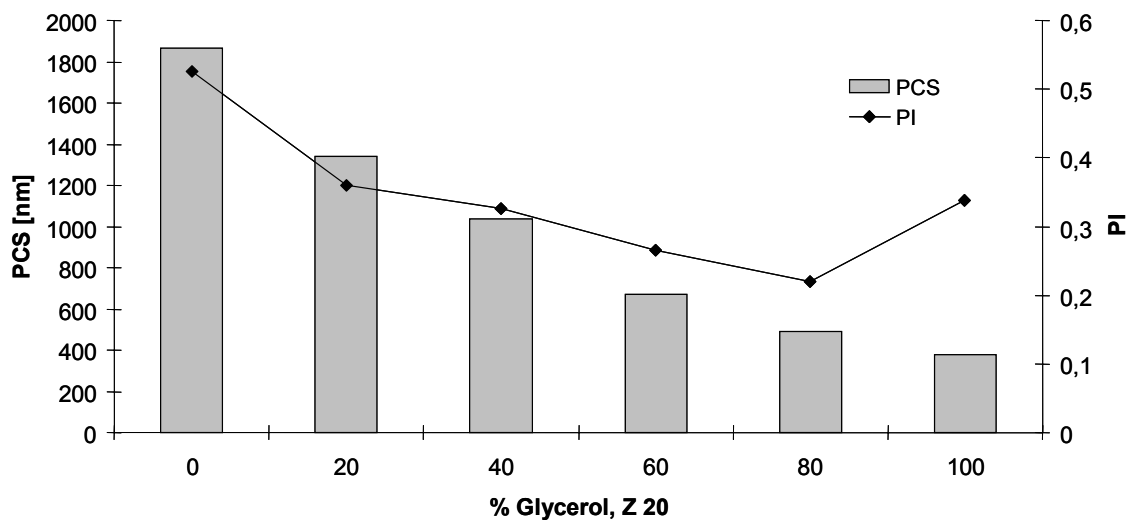


Abb. 4-11: PCS-Durchmesser und PI der Nanosuspensionen in Abhängigkeit vom Glycerolgehalt, Zyklus 20

Ein zunehmender Glycerolgehalt führte zu einer homogeneren Partikelgrößenverteilung, was durch die Abnahme des PIs deutlich wurde. Auffallend ist der Anstieg des PI bei der Nanosuspension ohne Wasserzusatz (100% Glycerol). Glycerol ist gekennzeichnet durch eine sehr hohe Viskosität, die ein schlechtes Gießverhalten mit sich bringt und die Verarbeitung der Suspensionen schwierig gestaltet. Durch die Zähigkeit blieben z.T. Partikel an den Homogenisatorteilen, besonders im Produktbehälter und am Becherglas, hängen und konnten nicht weiter zerkleinert werden. Dies erklärt die großen LD-Werte ($d_{99\%}$: 10 μm , Zyklus 20) und den ansteigenden PI. Bei alleiniger Betrachtung des mittleren PCS-Durchmessers wird das Problem nicht unbedingt erkannt. Diese Vermutung wurde durch mikroskopische Aufnahmen bestätigt. Es waren deutlich nicht zerkleinerte Amphotericin B-Partikel zu erkennen (Abb. 4-12 Bild C). Anhand der Mikroskopbilder kann weiterhin festgehalten werden, dass die Reduktion der mittleren Partikelgröße hauptsächlich durch Verhinderung der Agglomeratbildung erreicht wird (Bilder A-C). Lockere Agglomerate in Wasser können durch 5 minütige Ultraschallbehandlung getrennt werden. Der Partikeldurchmesser fiel von 2077 nm auf 472 nm (Schmidt, 2002). Die Viskositätszunahme durch den Glycerolzusatz verhinderte die Annäherung der Partikel. Anstatt zu agglomerieren blieben sie als Einzelpartikel in einem separaten Zustand. Ab einem Glycerolzusatz von 80% wird die Bearbeitung der Nanosuspensionen durch die hohe Viskosität erschwert. Reines Glycerol machte das Arbeiten fast unmöglich. Glycerol ist ein Pseudoemulgator und wirkt durch Viskositätserhöhung stabilisierend (Herabsetzen der Sedimentationsgeschwindigkeit, vgl. Stokes-Gesetz). Z.T. konnte ein geringes Partikelwachstum über den Zeitraum von 4 Wochen beobachtet werden (vgl. Tab. 4-3).

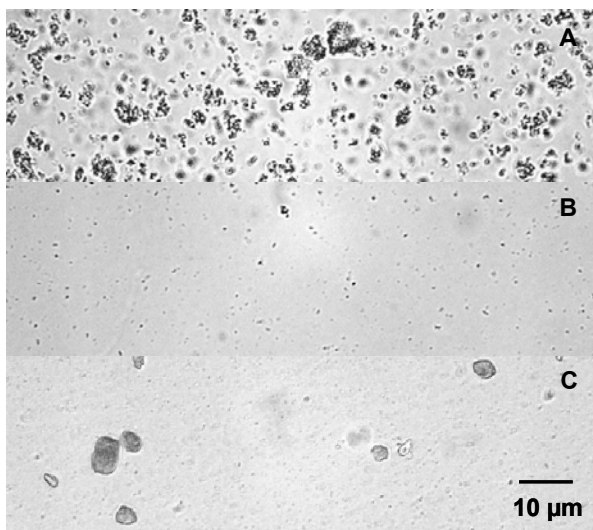


Abb. 4-12:
Mikroskopbilder, 630fache Vergrößerung, verdünnte Suspension (Z. 20) mit A: 0% Glycerolzusatz, B: 60% Glycerolzusatz, C: 100% Glycerol.

4.1.5.2 Bestimmungen von Viskosität, Dichte und Dielektrizitätskonstante

Um das Zetapotential im Originalmedium, in diesem Fall in den Glycerol-Wasser-Mischungen, messen zu können, müssen die Parameter, die zur Berechnung des Zetapotentials erforderlich sind, individuell vor der Messung in das PC-Programm eingegeben werden: *dynamische Viskosität* η , *Dielektrizitätskonstante* ε und *Dichte* ρ . Für Wasser sind diese Werte automatisch gespeichert. Die Werte wurden experimentell oder - soweit möglich - rechnerisch ermittelt.

Die *Viskosität* (Zähigkeit oder innere Reibung) ist als der Widerstand definiert, den ein flüssiger oder halbfester Stoff seiner Verformung entgegensetzt. Die *dynamische (absolute) Viskosität* wird wie folgt beschrieben:

$$\eta = \frac{\tau(\text{Schubspannung})}{D(\text{Schergeschwindigkeit})}$$

Durch Division mit der Dichte ρ lässt sich die absolute Viskosität in die *kinematische Viskosität* ν umrechnen:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}$$

Zur Bestimmung der kinematischen Viskosität bei 25 °C wurde ein Ubbelohde-Kapillarviskosimeter (Schott GmbH, Mainz) mit automatischer Zeiterfassungseinheit benutzt. Aus drei Einzelmessungen wurde ein Mittelwert gebildet, um die kinematische Viskosität ν und folgend die dynamische Viskosität η berechnen zu können.

Die Dichtebestimmung der Wasser-Glycerol-Mischungen erfolgte mit einem DMA 4500/5000 Dichtemessgerät (Anton Paar GmbH, Graz) bei 25 °C (Ermittlung des Mittelwertes aus drei Einzelmessungen).

Da angenommen wird, dass sich die Dielektrizitätskonstanten von Mischungen linear verhalten und sich aus dem Mischungsverhältnis der Einzelkomponenten errechnen lassen (Craig, 1995), konnten die Werte nach folgender Formel berechnet werden. Die Näherung ist ausreichend:

$$\varepsilon_{G/W} = (\% \text{ Glycerol} / 100) \times \varepsilon_G + (\% \text{ Wasser} / 100) \times \varepsilon_W$$

Die Abbildung 4-13 zeigt die Ergebnisse der Parameterbestimmungen. Um die Werte der Viskositäten deutlicher darstellen zu können, wurden die Werte für reines Glycerol (737,5 cSt, 928 mPas) nicht in die Grafik übernommen. Sie stimmen mit Daten aus der Literatur überein: 96% Glycerol (624,0 cSt), 100% Glycerol (1398,1 cSt) bei 20°C, 954 mPas (25°C) (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1977-78).

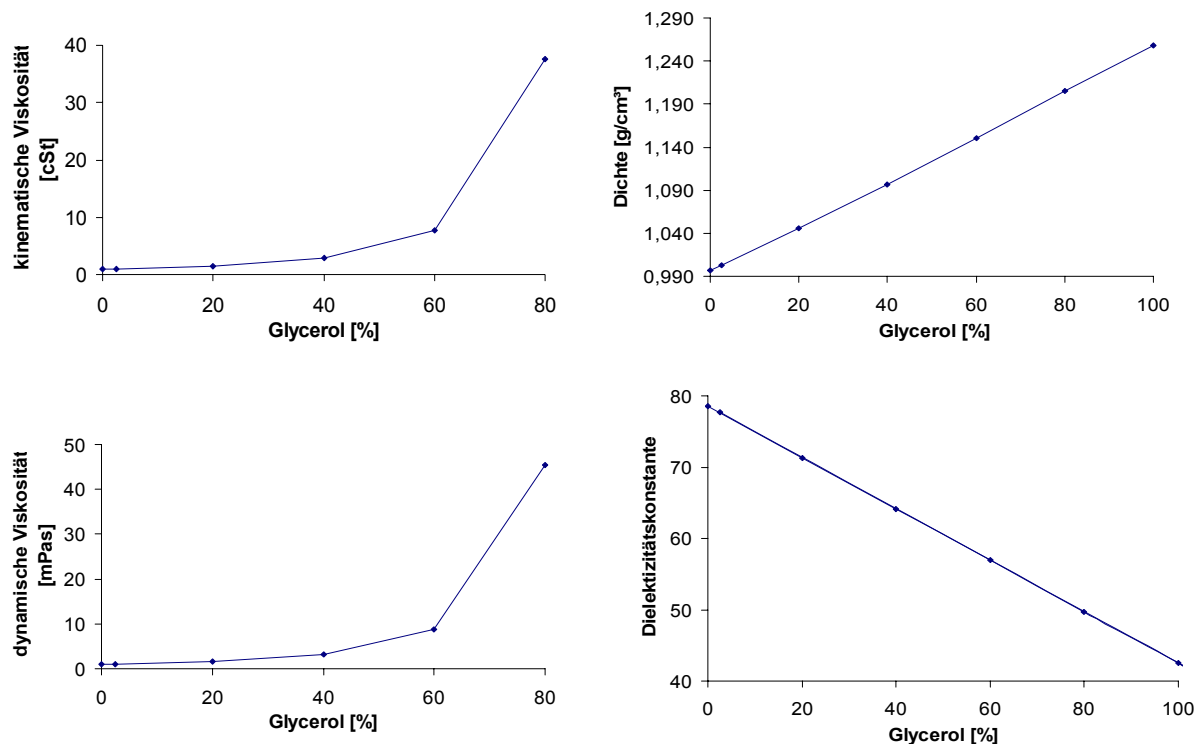


Abb. 4-13: Darstellung der Viskositäts-, Dichte- und Dielektrizitätskonstantenbestimmungen der Glycerol-Wasser-Mischungen

4.1.5.3 Bestimmung des Zetapotentials im Originalmedium

Die pH-Werte der Formulierungen nach dem 20. Zyklus lagen zwischen 5,0 und 5,4. Die Originalmedien, in denen die Suspensionen vermessen wurden, wiesen dieselben Werte auf. Beispiele der erhaltenen Zetapotentialkurven wurden in der Abbildung 4-14 dargestellt. Die Ergebnisse der Bestimmung aller Proben zeigt die Tabelle 4-3.

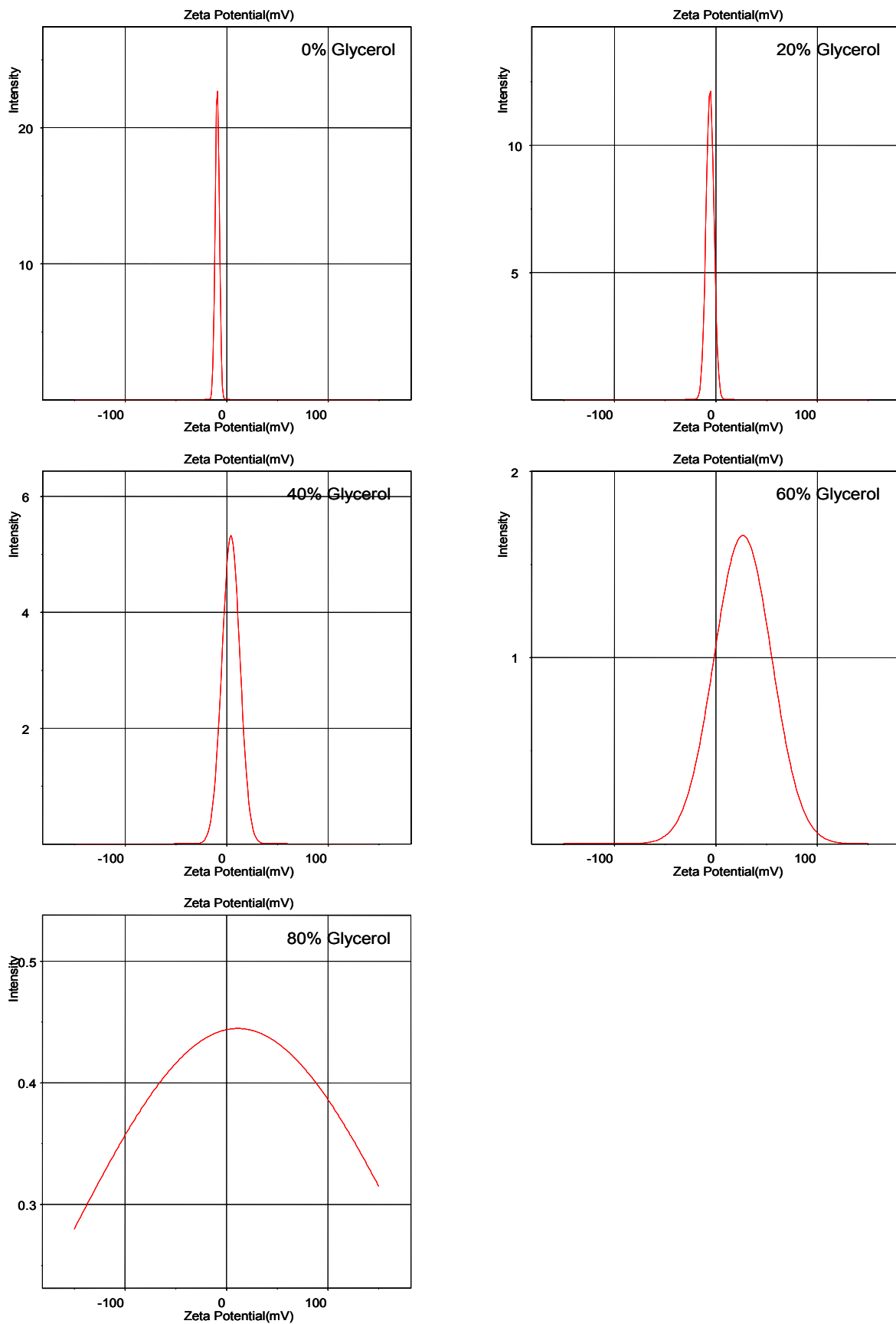


Abb. 4-14: Zetapotentialkurven der unterschiedlichen Formulierungen; die Bestimmung erfolgte in den Originalmedien (Glycerol-Wasser-Mischungen) der Suspensionen; Originalausdruck der Spalten des Zetasizers; y-Achse: Häufigkeit.

Je höher der Glycerolzusatz, desto mehr verschob sich das Zetapotential zum positiven Bereich, gekennzeichnet durch die Rechtsverschiebung der Kurven. Auffällig ist die zunehmende Verbreiterung der dargestellten Kurven (Abb. 4-14). Zwar wies die Formulierung mit 80% Glycerol ein Zetapotential von 4 mV auf, doch zeigte die Zetapotentialkurve eine Spanne von -100 bis +100 mV. Die Formulierungen mit 80% und 100% Glycerol konnten durch die hohe Viskosität kaum luftblasenfrei in die Schläuche des Zetasizers appliziert werden. Reines Glycerol konnte daher nicht vermessen werden.

Die Stabilisierung der Nanosuspensionen erfolgte vorwiegend durch die Viskositätszunahme. Aus verarbeitungstechnischen Gründen wurde für die Einarbeitung in Emulsionen die Formulierung mit 60% Glycerol gewählt. Bei einem Zusatz von mehr als 60% waren die Nanosuspensionen zu viskos. Die 60%ige Nanosuspension zeigte kaum noch Agglomeration der einzelnen kleinen Partikel.

4.1.5.3 Einarbeitung in die Emulsion

Die Herstellung der Emulsionen ($n = 2$) erfolgte mit einer 60%igen Glycerolsuspension (2,4% Amphotericin B, Zyklus 20, PCS: 699 nm, PI: 0,281) mit 10 und 15 Homogenisationszyklen. Es zeigte sich kein Unterschied, ob die Emulsionen mit 10 oder 15 Zyklen homogenisiert wurden. Mit einem $d_{99\%}$ von $306 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ (Z 10) und $309 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ (Z 15) und einem PCS-Durchmesser von $186 \text{ nm} \pm 1,5 \text{ nm}$ (PI: 0,115) und $182 \text{ nm} \pm 2,5 \text{ nm}$ (PI: 0,122) sind sie erwartungsgemäß genauso groß wie Emulsionen, in denen eine Nanosuspension mit ausschließlich Wasser als Dispersionsmedium eingearbeitet wurde ($d_{99\%}$ 309 nm, PCS: 195 nm, PI: 0,135).

Die Messung des Zetapotentials erfolgte in Leitfähigkeitswasser ($50 \mu\text{S}/\text{cm}$, pH 7,2) und im Originaldispersionsmedium (pH 6,5, dem pH-Wert der Emulsionen). Die Emulsionen zeigten ausreichend elektrostatische Stabilisierung. Alle Messwerte lagen im selben stabilen Bereich: mit etwa -42 mV in Wasser und mit etwa -50 mV im Originaldispersionsmedium, so dass eine gute Stabilität erwartet werden konnte.

Zyklus 10 (PCS $194 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$, PI 0,123) und Zyklus 15 (PCS $198 \text{ nm} \pm 0,2 \text{ nm}$, PI 0,111) zeigten nach Sterilisation keine Veränderung der Partikelgröße. Eine parallel mittels Mikroskopie erfolgte Charakterisierung der Emulsionen zeigte kein Partikelwachstum.

Würde eine schnellere und vergrößerte Einlagerung des Amphotericins in die Emulgator-schicht erfolgen, sollte dies zu einer verbesserten Autoklavierstabilität führen. Der

Arzneistoffgehalt der Emulsionen vor der Sterilisation lag zwischen 0,89 und 0,92 mg/mL, nach der Sterilisation lagen noch $88,2\% \pm 1,4\%$ bzw. $83,0\% \pm 2,4\%$ des Amphotericins in den Emulsionen die über 15 Zyklen bzw. 10 Zyklen homogenisiert wurden vor. Im Vergleich zu den Emulsionen aus vorherigen Untersuchungen wies die Inkorporation über eine Arzneistoffsuspension mit einem Glycerolanteil von 60% keine Vorteile auf. Daraus wurde erneut deutlich, dass die Agglomerate der Suspensionen mit 100% Wasser als Dispersionsmedium durch erneutes Homogenisieren während der Beladung der Emulsionen tatsächlich vollständig getrennt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass auf die Herstellung einer Emulsion mit Glycerol verzichtet werden kann.

Zusammenfassend gilt:

1. Glycerolzusatz minimiert die Flockung der Nanosuspension.
2. Der Kompromiss aus Partikelgröße und arbeitstechnisch vertretbarer Glycerol-Konzentration liegt bei 60 % Zusatz.
3. Da aber keine verbesserte Autoklavierstabilität festgestellt werden konnte, scheint der Flockungsgrad keinen Einfluss auf die Einlagerung des Amphotericin B in die Lecithinschicht zu haben.

4.1.6 Emulsionen auf der Basis von Sojalecithin

Bisher wurden die Optimierungsversuche der Amphotericin B-Formulierung hinsichtlich Herstellungsverfahren, Eilecithinkonzentration und der einzuarbeitenden Nanosuspension durchgeführt.

In einigen parenteralen Emulsionen wird Sojalecithin anstelle von Eilecithin eingesetzt. Beim Einsatz von Sojalecithin sind unerwünschte Wirkungen beschrieben worden, die wahrscheinlich durch Begleitstoffe des Sojalecithins verursacht wurden (Schubert and Wretlind, 1961). Seitdem aufgereinigtes Sojalecithin zur Anwendung kommt, werden diese Nebenwirkungen vermieden (Meyer et al., 1957; Mueller and Iacono, 1967). Eine typische Zusammensetzung von Ei- und Sojalecithin zeigt die Tabelle 4-4 (Lipoid, 2002a; Lipoid, 2002c).

Tab. 4-4: Zusammensetzung von Ei- und Sojalecithin

Zusammensetzung des Lecithins	[%]	
	Ei (Lipiod E 80)	Soja (Lipoid S 75)
Phospholipide		
Phosphatidylcholin (+LPC)	80,0-85,0	68,0-73,0
Phosphatidylethanolamin (PE)	7,0-9,5	7,0-10,0
Lysophosphatidylcholin (LPC)	max. 3,0	max. 3,0
Lysophosphatidylethanolamin (LPE)	max.0,5	-
Sphingomyelin (SP)	2,0-3,0	-
Unpolare Lipide		
Triglyceride	max. 3,0	max. 3,0
Cholesterin	max. 1,0	-
Freie Fettsäuren	max. 0,05	max. 0,5
DL- α -Tocopherol	0,05-0,1	0,1-0,2
Fettsäuren (FS)		
Palmitinsäure C 16:0	28-34	17-20
Stearinsäure C 18:0	12-15	2-5
Ölsäure C 18:1	26-30	8-12
Linolsäure C 18:2	13-18	58-65
Linolensäure C 18:3	max.1,0	4-6
Mehrfach unges. FS C 20 und höher	6-10	-

Die Bestandteile der beiden Lecithine erlauben möglicherweise unterschiedliche räumliche Dimensionen und Wechselwirkungen mit dem Arzneistoff. Sie verändern daher die Struktur der Lecithinschicht. Es besteht ein Unterschied in der Jodzahl der Lecithine. Sojalecithin ist weniger gesättigt als Eilecithin (Jodzahl Sojalecithin: 85-95, Eilecithin: 65-69).

Es sollte untersucht werden, ob eine andere Fettsäure- und Phospholipidzusammensetzung zu einer besseren Verkapselung von Amphotericin B führt und damit die Autoklavierstabilität positiv beeinflusst wird. Als Ausgangsemulsionen dienten hierfür eigens hergestellte Emulsionen auf der Basis von Lipofundin[®] MCT 10%, allerdings stabilisiert mit 0,8%, 1,2% und 2,4% Sojalecithin. Die Herstellung erfolgte unter Standardbedingungen (600 bar, 45 °C, 10 Zyklen, n = 2).

Bei der Charakterisierung der Nanosuspension fiel diese durch deutlich größere Agglomerate auf (d50%: 4,9 μ m, d99%: 11,6 μ m). Durch 5 minütige Ultraschallbehandlung sanken die Werte auf einen PCS-Durchmesser von 913 nm (PI 0,417) und LD-Werten von 0,524 μ m (d50%) und 2,346 μ m (d99%). Da bereits erfolgreich unhomogenisiertes Amphotericin B-Pulver in Emulsionen eingearbeitet werden konnte (Müller, 2001; Schmidt, 2002) und die Agglomerate der Suspension bei der Weiterverarbeitung wieder zerstört werden, können agglomerierte Suspensionen bedenkenlos zur Herstellung der Emulsionen eingesetzt werden.

Die Charakterisierung der Ausgangsemulsionen mit Sojalecithin und deren Beladung mit 1 mg/mL Amphotericin B zeigt die Abbildung 4-15.

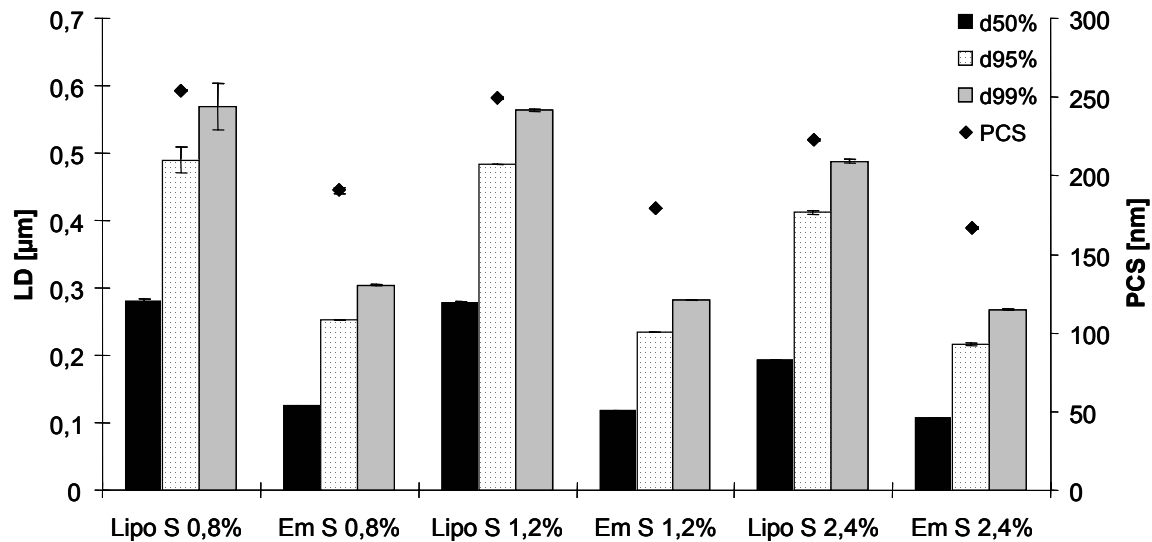


Abb. 4-15: LD- und PCS-Daten der Emulsionen mit unterschiedlichen Sojalecithinkonzentrationen; x-Achse: Lipo = Ausgangsemulsion Lipofundin® MCT 10%, stabilisiert mit x% Sojalecithin (S) und Em = beladene Amphotericin B-Emulsion.

Eine Erhöhung der Emulgatorkonzentration führte wiederum zu einer kleineren Partikelgröße, sowohl bei den Ausgangsemulsionen (PCS: 223-254 nm) als auch bei den beladenen Emulsionen (PCS: 167-191 nm). Während der Einlagerung von Amphotericin B kam es durch die Homogenisation zu einer Abnahme der Partikelgrößen um 60-70 nm. Die Zusammensetzung der Lecithine hatte keinen Einfluss auf die Partikelgröße, im Vergleich zu den Daten der vorhergehenden Untersuchung mit unterschiedlichen Eilecithinkonzentrationen (Kap. 4.1.3).

Die Zetapotentiale, gemessen in Leitfähigkeitswasser und im Originalmedium (pH 6,4) der beladenen Emulsionen, lagen bei -45 mV und damit geringfügig unter den Werten der Ausgangsemulsionen (-52 mV). Lediglich die Emulsionen mit 2,4% Sojalecithin ergaben im Originaldispersionsmedium einen Wert von -50 mV, der im Rahmen der Messungenauigkeit unverändert mit dem der anderen Emulsionen ist. Die Konzentration des Lecithins nahm auch bei dem Lecithin aus Soja kaum Einfluss auf die Ladung. Die Verkapselung von Amphotericin B in die Lecithinschicht führte bei allen Emulsionen unabhängig von der Rezeptur und den Prozessparametern zu einer geringen Abnahme des Zetapotentials. Durch

die Einlagerung des Arzneistoffs kommt es offensichtlich zu einer Veränderung des Monolayers aus Lecithin und somit zu einer Ladungsverschiebung.

Inwieweit die Emulsionen auch nach der Dampfdrucksterilisation physikalisch stabil waren, zeigte die Messung der PCS-Durchmesser nach Autoklavieren (121 °C, 15 min, Abbildung 4-16).

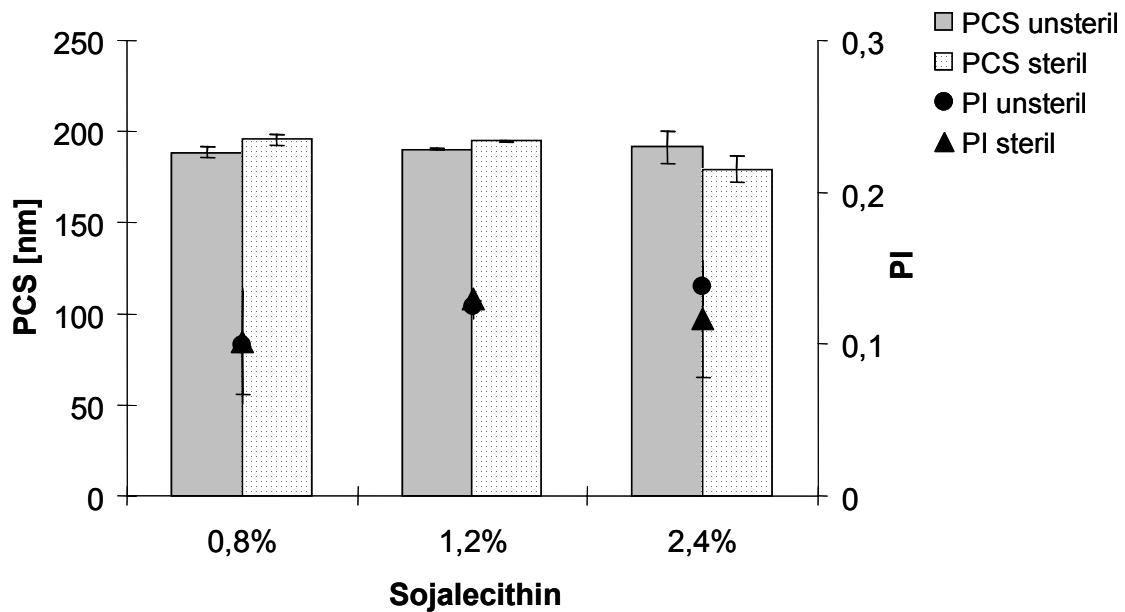


Abb. 4-16: PCS-Daten vor und nach der Sterilisation, 600 bar, 45 °C; unterschiedliche Sojalecithinkonzentrationen

Nach der Sterilisation der Proben zeigte der Partikeldurchmesser wenig Veränderung. Die Reduktion des Durchmessers um 13 nm bei der höchsten Sojalecithinkonzentration ließ vermuten, dass sich einige große Öltropfen gebildet hatten, die sich der PCS-Messung durch Aufrahmen entzogen. Anhand der Mikroskopbilder konnte die physikalische Stabilität bestätigt werden (Abb. 4-17). Es muss jedoch beachtet werden, dass je Emulsion nur eine Aufnahme gemacht wurde. Bei einer kritischen physikalischen Instabilität wäre der PCS-Durchmesser wesentlich stärker gestiegen, so dass von einer Messschwankung ausgegangen werden kann.

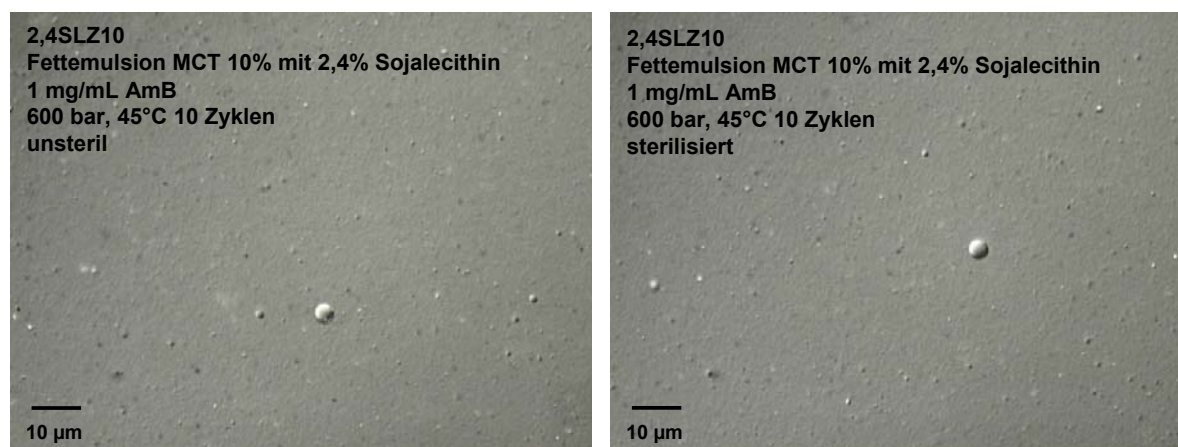


Abb. 4-17: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Emulsion mit 2,4% Sojalecithin vor und nach der Sterilisation

Die Untersuchungen zeigen, dass Soja- und Eilecithin gleichwertig einsetzbare Emulgatoren, bezogen auf die physikalische Stabilisierung während der Herstellung und des Autoklavierens, sind.

Um zu überprüfen, ob die Emulsionen mit Sojalecithin eine effektivere Einlagerung in die Monolayer ermöglichen und damit vor der chemischen Zersetzung einen Schutz bieten, sollte die Gehaltsbestimmung vor und nach Autoklavieren zeigen. Der in den unsterilen Proben gefundene Amphotericin B-Gehalt wurde gleich 100% gesetzt. Die Ergebnisse überraschten (vgl. Tab. 4-5).

Tab. 4-5: Amphotericin B-Gehalt nach Sterilisation der Emulsionen mit Sojalecithin

Emulsionen	Sojalecithin [% ± s]		
	0,8%	1,2%	2,4%
steril	0	47,1 ± 6,7	53,0 ± 0,3

Die Analytik, die 2-3 Tage nach Herstellung der Emulsionen und Transport ins externe Labor erfolgte, ergab ein breites Spektrum der Werte für den Gehalt an Amphotericin B. In den Emulsionen mit 0,8% Sojalecithin war mit einem Gehalt von 0,42 bis 0,58 mg/mL ungefähr nur noch die Hälfte des erwarteten Wertes von 1 mg/mL nachzuweisen. Für 1,2% Sojalecithin lag die Beladung zwischen 0,65 und 0,74 mg/mL und für 2,4% Sojalecithin zwischen 0,92 und 0,84 mg/mL. Somit muss schon während des Transportes eine starke Abnahme des Gehalts stattgefunden haben. Überraschend waren auch die Werte nach der Sterilisation. Zwar

stieg mit zunehmendem Lecithingehalt der Gehalt an Amphotericin B, allerdings war dieser mehr als unbefriedigend. Nach dem Autoklavieren war kein Amphotericin B mehr in den Emulsionen mit 0,8% Sojalecithin zu finden und nur noch 53% in den Emulsionen mit 2,4% Sojalecithin. Eine spätere Wiederholung des Versuchs zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die Sterilisation und Analytik einen Tag nach der Herstellung zeigten einen Gehalt von 0,47-0,55 mg/mL für die Emulsionen mit 0,8% Sojalecithin. Nach Sterilisation waren noch 13%, 48% und 42% AmB in den Emulsionen mit 0,8%, 1,2% und 2,4% Sojalecithin enthalten.

Der Versuch hat gezeigt, dass der Einsatz von Sojalecithin nicht empfohlen werden kann. Die Änderung der Lecithinart und damit der Fettsäure- und Phospholipidzusammensetzung führte in dieser Konstellation zu einer veränderten Struktur der Lecithinschicht und zu veränderten Arzneistoff-Lecithin-Wechselwirkungen. In der Folge kam es zu einer schlechteren Einlagerung des Amphotericins und zu einer negativen Beeinflussung der Autoklavierstabilität. Eine ausreichende chemische Stabilisierung konnte nicht mehr erreicht werden. Es kam zu einem unerwartet schnellen Abbau des Arzneistoffs selbst ohne Sterilisation. Normalerweise ist 1,2% Lecithin mehr als ausreichend, um Emulsionen zu stabilisieren. Durch eine Erhöhung der Sojalecithinkonzentration wurde in diesem Falle auch die Autoklavierstabilität erhöht. Möglicherweise hätte eine weitere Konzentrationserhöhung den chemischen Abbau reduziert.

4.1.7 Einarbeitung von hydrierten Lecithinen

Hydrierte Lecithine werden hauptsächlich in der Liposomentechnologie eingesetzt, um die Phasenübergangstemperatur und die damit verbundene Fluidität der Phospholipidschichten zu verändern. Unterschiedliche Hydrierungsgrade der Lecithine müssten daher auch die Eigenschaften von Emulsionen bzw. die Eigenschaften der aufgebauten Phospholipidgrenzschicht beeinflussen (Bock, 1994). Hydrierte Phospholipide weisen eine höhere Phasenübergangstemperatur auf als unvollständig hydrierte Lecithine. Lich untersuchte Emulsionen mit Lecithinen mit unterschiedlichem Hydrierungsgrad (Lich, 1991). Hierbei zeigte sich, dass die Kettenbeweglichkeit der Fettsäuren der hydrierten Lecithine im intermediären Gelzustand nicht ausreicht, um eine Stabilisierung der feinen Fetttropfchen zu gewährleisten. Es sollte untersucht werden, ob unterschiedlich hydrierte Lecithine die Amphotericin B-Einlagerung in die Lecithinschicht in Nanosuspension und Emulsion beeinflussen. Um eine ausreichende physikalische Stabilität der Dispersionen zu

gewährleisten, wurden die hydrierten Lecithine im Gemisch mit Eilecithin verarbeitet. Zur Anwendung kamen ein synthetisches vollständig gesättigtes Phospholipid (DMPC) und ein hydriertes Phosphatidylcholin aus Sojalecithin (S PC-3). 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DMPC) wird aus natürlichem sn-Glycero-3-phosphocholin (GPC) und analytisch reiner Myristinsäure hergestellt und besteht daher zu 99% aus Phosphatidylcholin mit mind. 98% Myristinsäure. S PC-3 hingegen besteht überwiegend aus 1,2-Distearoylphosphatidylcholin. In dem 98%igen Phosphatidylcholin sind die Fettsäuren natürlich verteilt. Mit ca. 14% und 85% herrschen aber die Palmitin- und hauptsächlich die Stearinsäure vor (Lipoid, 2002b; Lipoid, 2002d). Die Jodzahl von S PC-3 wird mit max. 2 angegeben.

4.1.7.1 Nanosuspension mit DMPC

Das 2,4%ige Lecithin der Suspension bestand aus einem Verhältnis von DMPC:Eilecithin von 2:1. Eine Nanosuspension mit S PC-3 konnte nicht hergestellt werden. In Tabelle 4-6 sind die Partikelgrößen der Amphotericin B-Nanosuspension aufgeführt. Durch Ultraschall wurden die Partikel von 2671 auf 952 nm zerkleinert. Die Abbildung 4-18 zeigt ein Bild der agglomerierten Suspension.

Tab. 4-6: Teilchengrößen einer Amphotericin B-Nanosuspension DMPC:Eilecithin (2:1)

Partikelgröße	AmB-NS
LD d10% [μm]	0,436
LD d50% [μm]	2,152
LD d90% [μm]	3,137
LD d95% [μm]	3,376
LD d99% [μm]	3,787
LD d100% [μm]	4,656
PCS Ø [nm]	2671
PI	0,458
PCS nach Ultraschall-Behandlung [nm]	952
PI nach Ultraschall-Behandlung	0,500

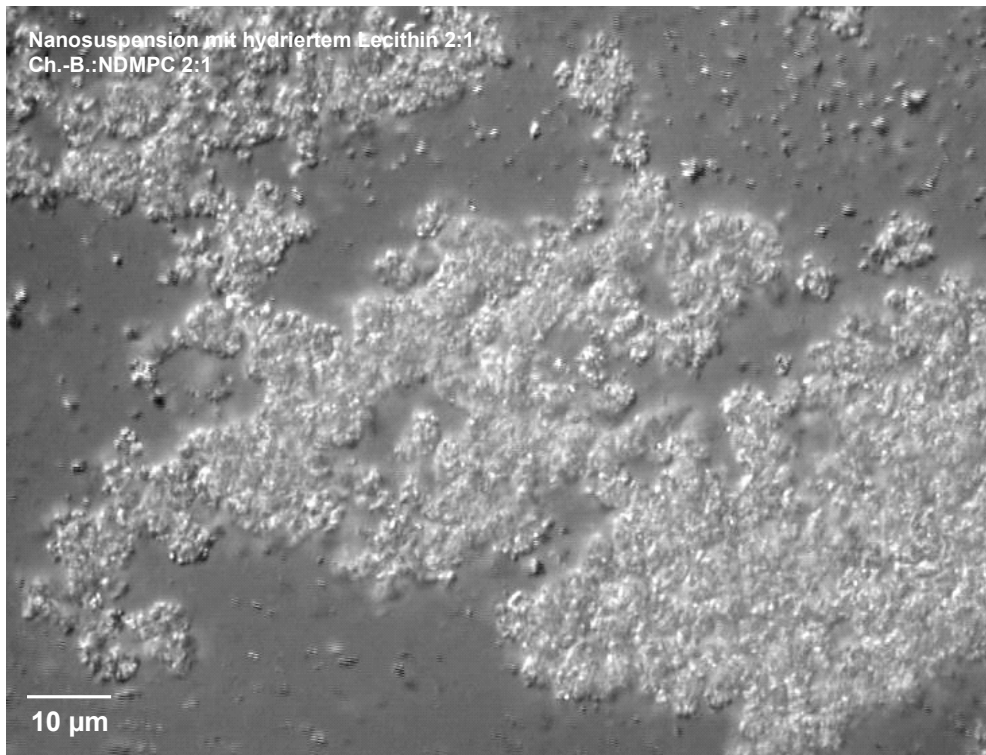


Abb. 4-18: Lichtmikroskopische Aufnahme der Nanosuspension mit DMPC und Eilecithin (2:1)

Anschließend wurde die Nanosuspension, wie gehabt, in Lipofundin[®] MCT 10% (0,8% Eilecithin) eingearbeitet. Tabelle 4-7 zeigt Partikelgröße, Zetapotential und Amphotericin B-Gehalt der Emulsionen. Nach der Dampfdrucksterilisation wurde mit 95% ein nahezu unveränderter Amphotericin B-Gehalt ermittelt.

Tab. 4-7: Charakterisierung der produzierten Emulsionen mit der Nanosuspension aus DMPC und Eilecithin (n = 2)

Messparameter	Emulsionen mit NS (DMPC:Eilecithin)
LD d50% [$\mu\text{m} \pm \text{s}$]	$0,133 \pm 0,001$
LD d95% [$\mu\text{m} \pm \text{s}$]	$0,264 \pm 0,001$
LD d99% [$\mu\text{m} \pm \text{s}$]	$0,311 \pm 0,001$
PCS Ø [$\text{nm} \pm \text{s}$]	182 ± 3
PI	$0,105 \pm 0,010$
PCS Ø [$\text{nm} \pm \text{s}$] nach Sterilisation	201 ± 1
PI nach Sterilisation	$0,091 \pm 0,024$
ZP (50 $\mu\text{S/cm}$ -Wasser) [mV] (pH 7,2)	$-37,2 \pm 1$
ZP (OM) [mV] (pH 7,2)	$-55,4 \pm 0,1$
AmB-Gehalt nach Sterilisation [% $\pm \text{s}$]	$95,3 \pm 1,5$

Das Gemisch aus DMPC und Eilecithin (2:1) in der Suspension schien die Einlagerung des Amphotericins in die Lecithinschicht zu begünstigen. Der Arzneistoff wurde deshalb vor äußeren Einflüssen besser geschützt und damit die Autoklavierstabilität erhöht.

4.1.7.2 Emulsionen mit hydrierten Lecithinen

Die Ausgangsemulsionen für diese Versuchsreihe wurden extern unter industriellen Bedingungen hergestellt. Mischungen aus DMPC mit Eilecithin oder S PC-3 mit Eilecithin wurden getestet. Der Gesamtgehalt an Lecithin betrug 1,2%, da mit dieser Konzentration bisher die meisten Ergebnisse vorlagen. Es wurden sowohl Nanosuspensionen mit teilhydrierten Lecithinen als auch ausschließlich mit Eilecithin eingesetzt, um sie in den verschiedenen Emulsionen zu verarbeiten. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Emulsionen.

Tab. 4-8: Zusammensetzung und Bezeichnung der Formulierungen (1 mg/mL) basierend auf Lipofundin® MCT 10%, jedoch mit wechselnder Lecithinzusammensetzung; L = Leeremulsion

Formulierung	2,5%ige AmB-NS	Lipofundin® MCT 10%
AL	-	1,2% Lecithin (1% DMPC/99% Ei)
BL	-	1,2% Lecithin (10% DMPC/90% Ei)
CL	-	1,2% Lecithin (1% SPC-3/99% Ei)
DL	-	1,2% Lecithin (10% SPC-3/90% Ei)
EL		0,8% Lecithin (100% Eilecithin)
F	DMPC:Ei (2:1)	1,2% Lecithin (1% DMPC/99% Ei)
G	DMPC:Ei (2:1)	1,2% Lecithin (10% DMPC/90% Ei)
H	DMPC:Ei (2:1)	1,2% Lecithin (1% SPC-3/99% Ei)
I	DMPC:Ei (2:1)	1,2% Lecithin (10% SPC-3/90% Ei)
J	DMPC:Ei (2:1)	0,8% Lecithin (100% Eilecithin)
K	Ei	1,2% Lecithin (1% DMPC/99% Ei)
L	Ei	1,2% Lecithin (10% DMPC/90% Ei)
M	Ei	1,2% Lecithin (1% SPC-3/99% Ei)
N	Ei	1,2% Lecithin (10% SPC-3/90% Ei)
O	Ei	0,8% Lecithin (100% Eilecithin)

Zunächst wurden die Emulsionen über Partikelgrößenanalytik charakterisiert und die Stabilität nach erneuter Homogenisation überprüft (vgl. Abb. 4-19). Die Ausgangsemulsionen (L für Leeremulsionen) lagen alle im selben Größenbereich. Mit einem PCS-Durchmesser von 265 nm (PI: 0,151, d50%: 339 nm, d99%: 658 nm) war die Lipofundin® MCT 10%-Emulsion mit 1% SPC-3 (Formulierung CL) am größten und mit 250 nm (PI: 0,141, d50%: 307 nm, d99%: 615 nm) die Lipofundin® MCT 10%-Emulsion mit 1% DMPC (Formulierung AL) am kleinsten. Die Unterschiede waren bedeutungslos. Mit Zunahme des Hydrierungsgrades wurde in der Arbeit von Bock (1994) eine Zunahme der Partikelgrößen beschrieben. Eine geringe Größenzunahme konnte auch hier bestätigt werden, obwohl der Anteil an hydrierten Lecithinen z.T. sehr gering war. Eine Erklärung für dieses Verhalten liegt in den unterschiedlichen Fluiditäten der Lecithinmembranen. Je höher der Hydrierungsgrad eines Lecithins ist, desto rigider wird die von ihm aufgebaute Grenzschicht (Parnham, 1992). Die zur Dispergierung erforderliche Energie wird größer.

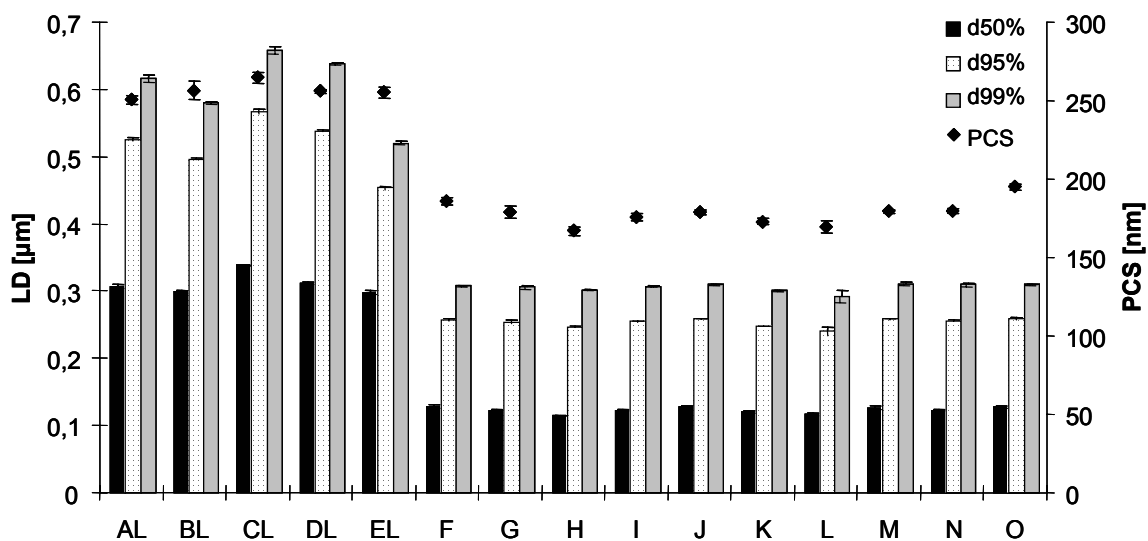


Abb. 4-19: Partikelgrößenbestimmung der Leeremulsionen (AL-EL) und der beladenen Emulsionen mit 1 mg/mL Amphotericin B der verschiedenen Formulierungen; Zusammensetzung der Formulierungen siehe Tab. 4-8, n = 2.

Aus Abbildung 4-19 ist ebenfalls ersichtlich, dass die beladenen Emulsionen eine Verkleinerung der Partikeldurchmesser erfahren hatten, die in der Größenordnung der bisherigen Emulsionen lag. Die mit Amphotericin B beladenen Emulsionen zeigten nach der Homogenisation Partikelgrößen zwischen 167 nm (Formulierung H) und 195 nm

(Formulierung O). Der PI lag zwischen 0,10 und 0,13 und charakterisierte Emulsionen mit einer engen Partikelgrößenverteilung.

Die Messung des Zetapotentials in Leitfähigkeitswasser (pH 6,5) ergab für die Ausgangs bzw. Leeremulsionen Werte mit etwa -38 mV. Es waren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationen zu erkennen. Auch die beladenen Emulsionen verhielten sich untereinander gleich (pH 6,4). Es wurde mit Potentialen um -33 mV eine geringe Verschiebung zu kleineren Werten beobachtet.

Die untersuchten Emulsionen blieben nach der Temperaturbelastung durch Sterilisation nach Standardbedingungen physikalisch stabil (Abb. 4-20), die Partikelgrößenlagen zwischen 191 nm (Formulierung N) und 206 nm (Formulierung F).

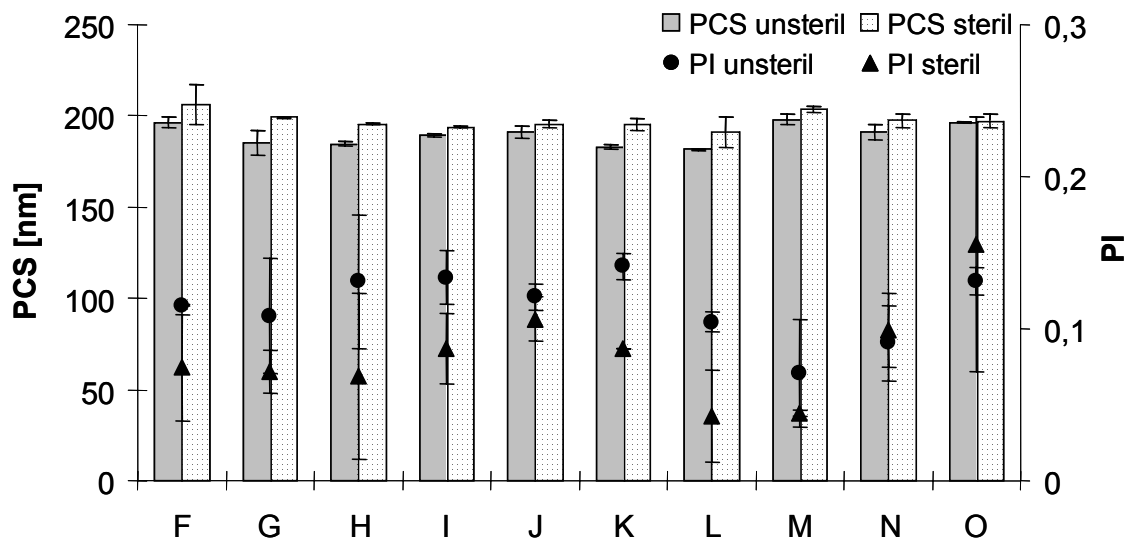


Abb. 4-20: PCS-Werte verschiedener Emulsionen vor und nach der Sterilisation; Abkürzung siehe Tab. 4-8.

Die physikalische Stabilität erwies sich unabhängig davon, ob Amphotericin B in einer Suspension eingearbeitet wurde, die mit Eilecithin oder einer Mischung mit teilhydrierten Lecithinen stabilisiert war. Ebenfalls zeigte sich kein Unterschied, ob mit teilhydrierten Lecithinen oder ausschließlich mit Eilecithin stabilisierte Ausgangsemulsionen verwendet wurden.

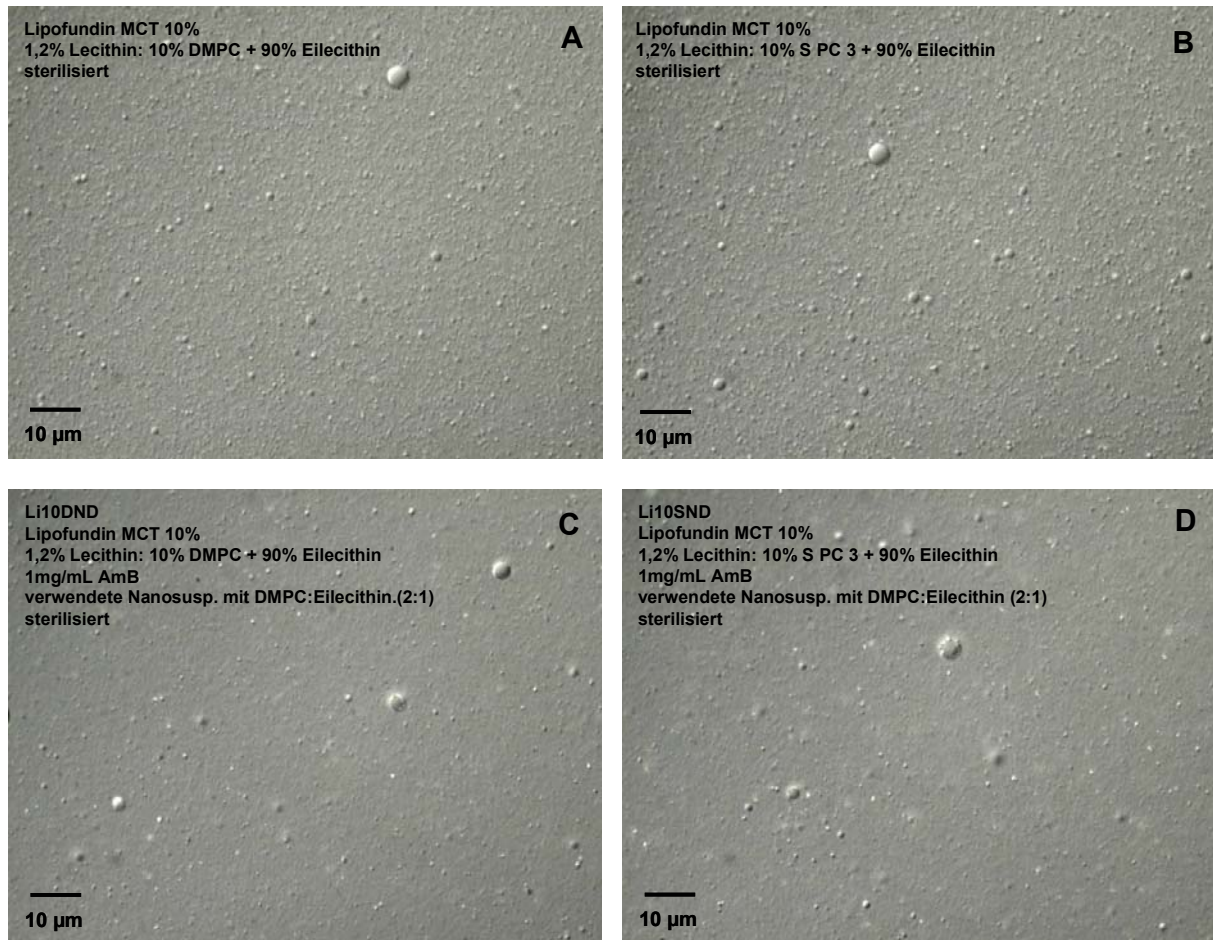


Abb. 4-21: Mikroskopaufnahmen der Ausgangsemulsionen (A: mit 10% DMPC, B: mit 10% SPC-3) und der sterilisierten beladenen Emulsionen G (Bild C) und I (Bild D)

Lichtmikroskopische Aufnahmen (beispielhafte Aufnahmen s. Abb. 4-21) belegten die Ergebnisse. Es sind nur vereinzelt Tropfen über 3 µm zu erkennen.

Neben der physikalischen Stabilität war nun noch die chemische Stabilität des Arzneistoffs nachzuweisen. Die vorherigen Untersuchungen (Kap. 4.1.7.1) zeigten eine viel versprechende Autoklavierstabilität. Aus der Abbildung 4-22 wird ersichtlich, dass die beladenen Emulsionen eine ähnliche chemische Autoklavierstabilität mit einem Arzneistoffabbau von 13-20% zeigten. Alle Ergebnisse setzen sich aus $n = 2$ zusammen, mit Ausnahme der Ergebnisse mit Lipofundin[®] MCT 10% (0,8% Eilecithin) mit $n = 6$. Im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen konnte die chemische Stabilität des Arzneistoffs in den Emulsionen jedoch nicht erhöht und die viel versprechenden Ergebnisse aus Kapitel 4.1.7.1 konnten nicht bestätigt werden.

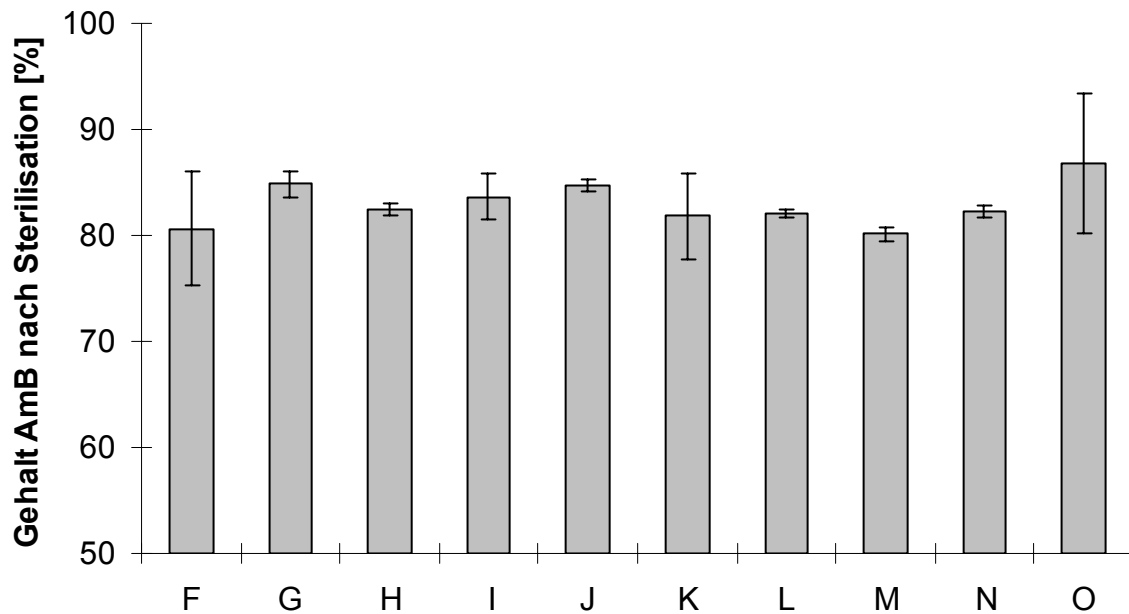


Abb. 4-22: Amphotericin B-Gehalt nach Sterilisation der unterschiedlichen Formulierungen
(s. Tab. 4-8, alle n = 2 außer O: n = 6)

In dieser Studie wurde gefragt, ob Emulsionen auf der Basis von hydrierten Lecithinen die Einlagerung des Amphotericin B in die Lecithinschicht fördern und dadurch die Stabilität des Arzneistoffs während der Autoklavierung erhöhen. Nach den Versuchen mit Sojalecithin lag die Vermutung nahe, dass sich Lecithine mit einer hohen Jodzahl als ungünstig für die Stabilisierung erweisen würden. Die Kombination des Eilecithins mit hydrierten Lecithinen sehr geringer Jodzahl brachte keine Verbesserung der Einlagerung. Somit scheinen noch andere Faktoren für eine gute Verkapselung des Amphotericin B eine Rolle zu spielen.

DMPC befindet sich lediglich in einem Produkt auf dem Markt. In ABELCET[®] liegt Amphotericin B eingebettet in einen Komplex (1:1) aus den zwei Phospholipiden DMPC und DMPG (7:3) vor. S PC-3 findet noch keine Anwendung. Da diese Lecithine sehr teure Hilfsstoffe sind (4000 €/kg für DMPC, 700 €/kg für S PC-3 und 250 €/kg für Eilecithin) und z.T. noch der Zulassung und Erprobung bedürfen, wurde das bewährte Eilecithin zwecks leichter Zulassung und auch aus Kostengründen weiterhin für die Emulsionen eingesetzt.

4.1.8 Zusammenfassende Diskussion des Rezepturscreenings

Amphotericin B ist schwer löslich in öligen und wässrigen Medien und kann wegen seines amphiphilen Charakters in die Lecithinschicht zwischen öliger und wässriger Phase eingelagert werden (Egito, 2002; Muller et al., 2004; Washington et al., 1988). Die dauerhafte Verkapselung von Amphotericin B in die Phospholipidschicht und die chemische Instabilität des Arzneistoffs stellen eine große Herausforderung dar. Um auf organische Lösungsmittel zu verzichten und das effektive Einbetten in die hydrophoben Bereiche zu erleichtern, wurde die Hochdruckhomogenisation gewählt.

Amphotericin B zeigt eine hohe Affinität zu Sterolen. Die Art der Wechselwirkung wird z.T. mit dem Aggregationszustand, ob also der Arzneistoff als eine aggregierte oder eine monomere Form vorliegt, in Verbindung gebracht. Monomere weisen eine Aktivität gegen Ergosterol auf, aggregierte Formen hingegen eine Aktivität sowohl gegen Ergosterol als auch gegen Cholesterol (Barwicz and Tancrede, 1997; Egito, 2002; Egito et al., 1996; Schreier et al., 2000), wodurch die Toxizität des Arzneistoffs begründet ist. Andere Autoren beschreiben, dass generell eine spezifischere Interaktion mit Ergosterol als mit Cholesterol beobachtet wurde (Bolard, 1986; Gruda and Dussault, 1988). AmBisome[®] wird durch ionische Wechselwirkungen mit Phosphatidylglycerol und der Bindung zwischen Cholesterol und Amphotericin B stabilisiert (Bekersky, 1999; Wong-Beringer et al., 1998). ABLC enthält DMPC und DMPG. Moribe et al. (1999) bestätigten, dass die Einkapselung in Liposomen von der Fettzusammensetzung abhängig ist. Sie untersuchten Liposomen mit wechselnder Zusammensetzung aus Dipalmitoyl-PC (DPPC), Cholesterol und Distearoyl-phosphatidyl-Ethanolamin-PEG (DSPE-PEG). Die Anwesenheit von Cholesterol in DPPC-Liposomen reduzierte die verkapselte Amphotericin B-Menge, die Anwesenheit von DSPE-PEG erhöhte sie.

Cholesterol und Ergosterol sind sehr ähnliche Moleküle. Ergosterol besitzt eine zusätzliche Methylgruppe, eine Doppelbindung in der Seitenkette und eine zusätzliche Doppelbindung im Steroidring. Die Amphotericin B-Sterol-Interaktion erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen der 7 konjugierten Doppelbindungen des Amphotericin B-Moleküls (Barwicz and Tancrede, 1997). Welcher Strukturteil der Steroide eine Rolle spielt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Während des Rezepturscreenings wurden daher zusätzlich zu der Änderung der Herstellungsparameter neben Eilecithin auch unterschiedliche Lecithine verschiedener Herkunft in den Formulierungen getestet. Werden die zusätzlichen Doppelbindungen in Ergosterol für die Wechselwirkungen verantwortlich gemacht, könnte eine gute

Amphotericin B-Verkapselung durch Sojalecithin erreicht werden. Im Gegensatz zum Eilecithin besitzt Sojalecithin eine höhere Konzentration an ungesättigten Fettsäuren. Sojalecithin erwies sich in keiner der eingesetzten Konzentrationen als geeignet. Der durch eine geringe chemische Stabilität gekennzeichnete Einschluss wurde sogar bedeutend verschlechtert. Schon während der ersten Tage zersetzte sich bis zu 50% Amphotericin B, so dass bereits vor dem Autoklavieren nur eine geringe Menge des Arzneistoffs noch vorhanden war. Der Gehalt nach Autoklavieren betrug 0-53% mit steigender Sojalecithinkonzentration. Im Gegensatz zum Sojalecithin wurden daraufhin hydrierte Lecithine natürlichen und synthetischen Ursprungs in den Formulierungen verarbeitet. Die untersuchten Formulierungen, die Suspensionen und Emulsionen deren Lecithin aus Mischungen mit hydrierten Lecithinen und Eilecithin bestand, ergaben eine gleichwertige Autoklavierstabilität im Vergleich mit der Standardrezeptur mit Eilecithin.

In weiteren Versuchen wurde das Einlagerungspotential verschiedener Eilecithinkonzentrationen und Tween[®] 80 getestet. Dabei zeigte sich, dass eine Eilecithinkonzentration von 0,6% zu gering ist, um gleichzeitig die Emulsionstropfen physikalisch zu stabilisieren und zusätzlich den Arzneistoff vor chemischer Zersetzung zu schützen. Auch die 4fache Menge an Eilecithin konnte die Verkapselung in die Lecithinschicht nicht verbessern.

Bei der Herstellung von Amphotericin B-Emulsionen mit unterschiedlicher Anzahl von Homogenisationszyklen konnte keine eindeutige Abhängigkeit der chemischen Stabilität von der Zyklenzahl nachgewiesen werden. Der Amphotericin B-Gehalt nach der Dampfdrucksterilisation lag hier zwischen 77 und 91%. Auch eine weitere Reduzierung der eingebrachten Energie durch eine De-Novo-Herstellung zeigte keine zusätzliche Stabilisierung. Der Amphotericin B-Gehalt lag zwischen 81 und 87% bei den Emulsionen mit 0,8 und 1,2% Eilecithin.

Die Entwicklung einer Glycerol-modifizierten Nanosuspension konnte den Flockungsgrad der Suspensionen herabsetzen. Mit zunehmendem Glycerolgehalt wurde eine Reduktion der Partikelgröße beobachtet. Eine Erklärung für dieses Verhalten liegt in der Viskositätszunahme des Dispersionsmediums. Durch das Einarbeiten einer Amphotericin B-Suspension mit 60% Glycerol in Lipofundin[®] MCT 10% wurde gezeigt, dass der Flockungsgrad keinen Einfluss auf die Einlagerung des Arzneistoffs in die Lecithinschicht hat. Dadurch wurden Schmidts Daten bestätigt, dass auch problemlos aggregierte Suspensionen für eine Emulsionsherstellung mittels Hochdruckhomogenisation eingesetzt werden können.

Bei keiner der untersuchten Amphotericin B-Formulierungen wurde eine physikalische Instabilität während der Produktion oder nach der Dampfdrucksterilisation unter Standardbedingungen beobachtet.

Mit der Herstellungstechnik der Hochdruckhomogenisation konnten unter definierten Bedingungen physikalisch und chemisch stabile Amphotericin B-beladene Emulsionen hergestellt werden. Verschiedene Ansätze im Hinblick auf Veränderung der Nanosuspensionsformulierung, der eingesetzten Emulsionen (Veränderung der Lecithinkonzentration, Einsatz von Soja-, Ei-, und hydrierten Lecithinen) und Zyklenzahlen zeigten, dass nach der Dampfdrucksterilisation ein Amphotericin B-Gehalt von über 95% erreicht werden kann. Unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren, wie z.B. Wirtschaftlichkeit und Erleichterung der Zulassung wurde nachfolgend mit Lipofundin[®] MCT 10% (0,8% Eilecithin) und folgenden Herstellungsparametern weiter gearbeitet: 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen und Einsatz der Nanosuspension mit 2,4% Eilecithin. Bei dieser Rezeptur konnte nach Sterilisation ein Gehalt von bis zu 97% erhalten werden. Alternativ kann auch auf eine aseptische Herstellung ausgewichen werden, falls keine ausreichende chemische Stabilisierung während der thermischen Belastung durch das Autoklavieren erzielt werden kann.

4.2 Zetapotential-pH-Profile beladener und unbeladener Emulsionen

Die Anwesenheit von Emulgatoren an der Öl-Wasser-Grenzschicht führt zu einer mechanischen Grenzschicht, um Koaleszenz zu verhindern. Ein zusammenhängender, dichter Film führt normalerweise zu einer guten Stabilität und kann meist durch einfache Mischung von Emulgatoren oder Emulgatoren mit Co-Emulgatoren erreicht werden (Davis, 1982). Ist die Festigkeit des Tensidfilms hoch genug, können zwei Tropfen beim Aufeinanderstoßen wie Bälle voneinander abprallen. Bei einigen Emulgatoren spielt zusätzlich die elektrostatische Abstoßung gleichgeladener Emulsionstropfen eine bedeutende Rolle. Dissoziierte Gruppen im hydrophilen Bereich des Emulgators laden zusätzlich die Emulsionstropfen auf. Die Anwesenheit von ionischen Lipiden erhöht diesen Effekt. Frühere Versuche, Emulsionen mit reinen Phospholipiden wie PC und PE zu stabilisieren, scheiterten (Davis, 1974), da sie weder gute mechanische noch elektrostatische Barrieren aufzubauen vermögen. Eine akzeptable Emulsionsstabilität kann erreicht werden, indem ein Lecithin mit ausreichend negativ geladenem Phospholipid gewählt wird (Rydhag, 1979).

Funktionelle Gruppen auf den Partikeln dissoziieren unterschiedlich bei gegebenem pH-Wert. Mit amphoterem Lecithin stabilisierte O/W-Emulsionen weisen auf der Partikeloberfläche gleichzeitig protonierbare Aminogruppen (positives Zetapotential im stark sauren) als auch dissoziiierbare Säuregruppen auf (negatives Zetapotential oberhalb des „point of zero charge“). Um Emulsionen genauer zu charakterisieren, müssen Zetapotentialmessungen bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt werden, um ein Zetapotential-pH-Profil zu erstellen. (Müller, 1996a). Somit werden alle funktionellen Gruppen erfasst und es kann abgeschätzt werden, in welchen pH-Bereichen eine ausreichende elektrostatische Abstoßung der Formulierung vorliegt. Allerdings kommt es durch die pH-Einstellung mit NaOH oder HCL zu einer unvermeidbaren Überlagerung durch den Effekt der sich ändernden Elektrolytkonzentration.

50-100 µL Emulsion wurden mit 100 mL bidest. Wasser verdünnt. Das Einstellen des pH-Wertes erfolgte durch Zugabe von verdünnter NaOH bzw. HCl. Die Abbildung 4-23 zeigt beispielhaft Zetapotential-pH-Profile von Amphotericin B-haltigen Emulsionen und ihren Ausgangsemulsionen. Die Untersuchungen wurden z.T. erst mehrere Wochen nach der Herstellung der Emulsionen durchgeführt. Durch Lagerung kann sich das Zetapotential durch Abbauprodukte verändert haben (Boberg, 1964; Kawilarang et al., 1980; Müller et al., 1992; Washington and Davis, 1987).

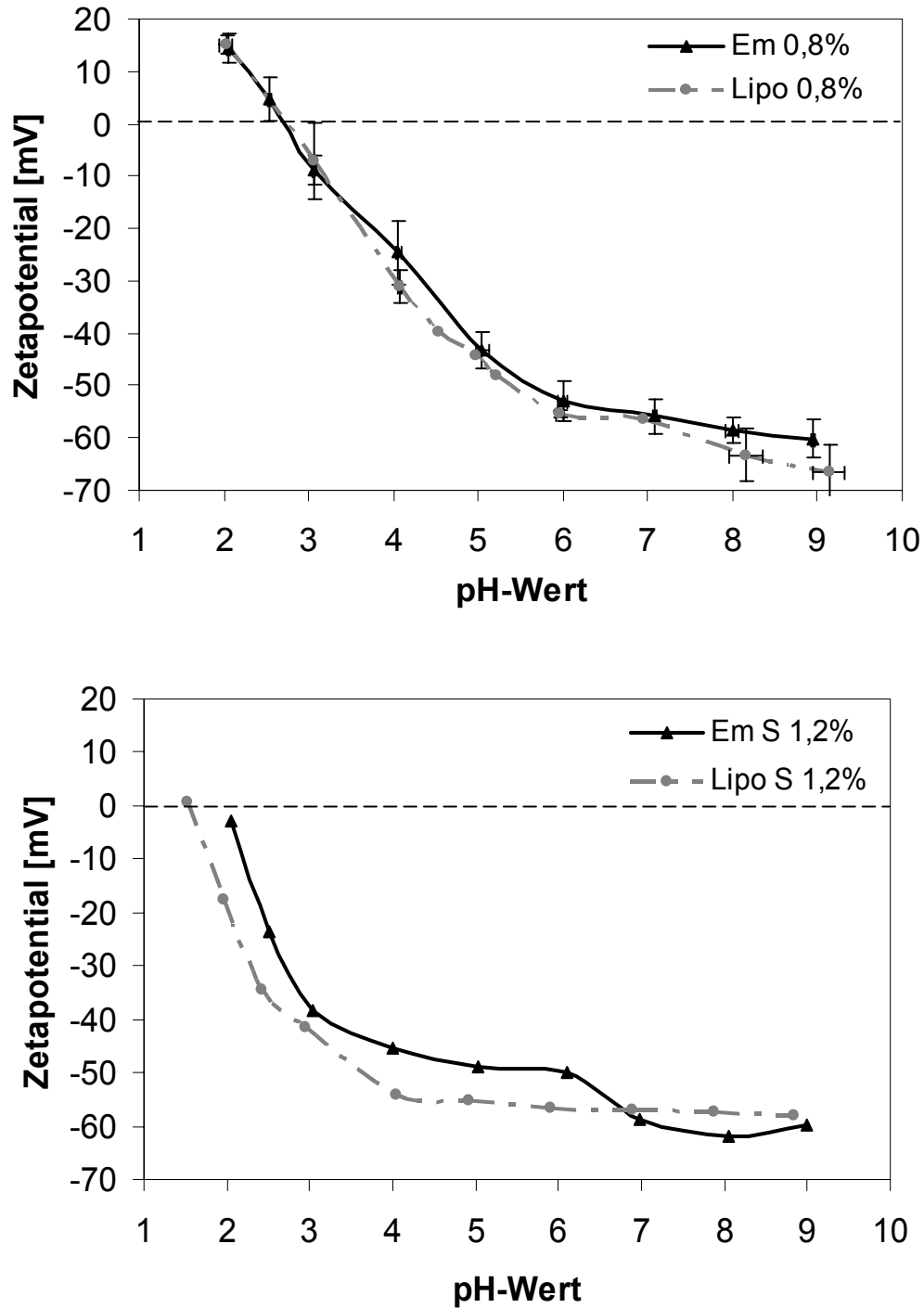


Abb. 4-23a: Zetapotential-pH-Profile der 1 mg/mL Amphotericin B-Emulsionen und deren Ausgangsemulsionen stabilisiert mit 0,8% Eilecithin (oben) und 1,2% Sojalecithin (unten)

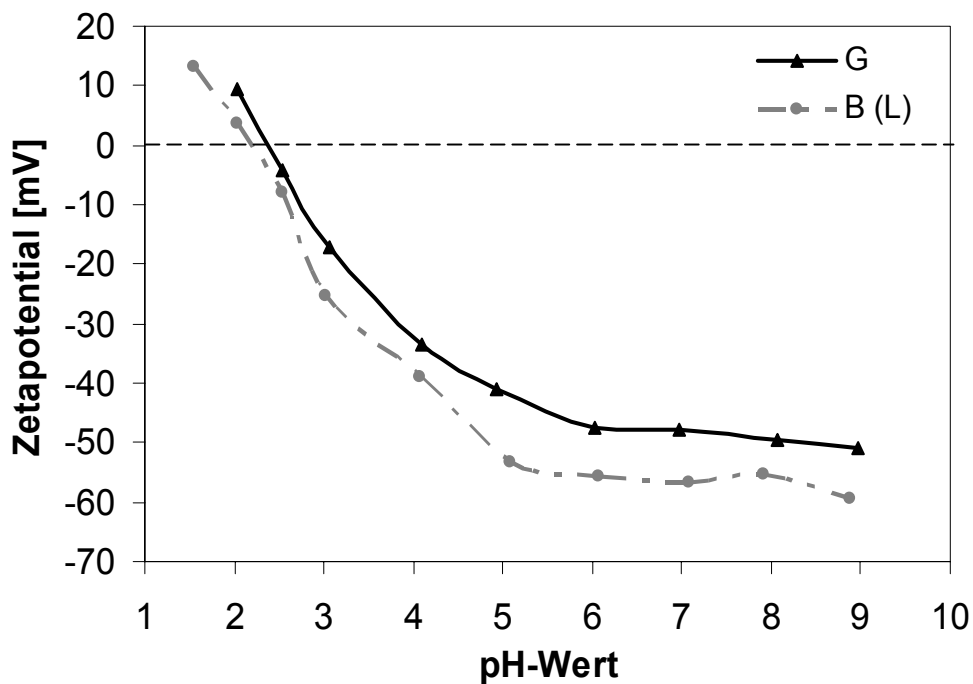
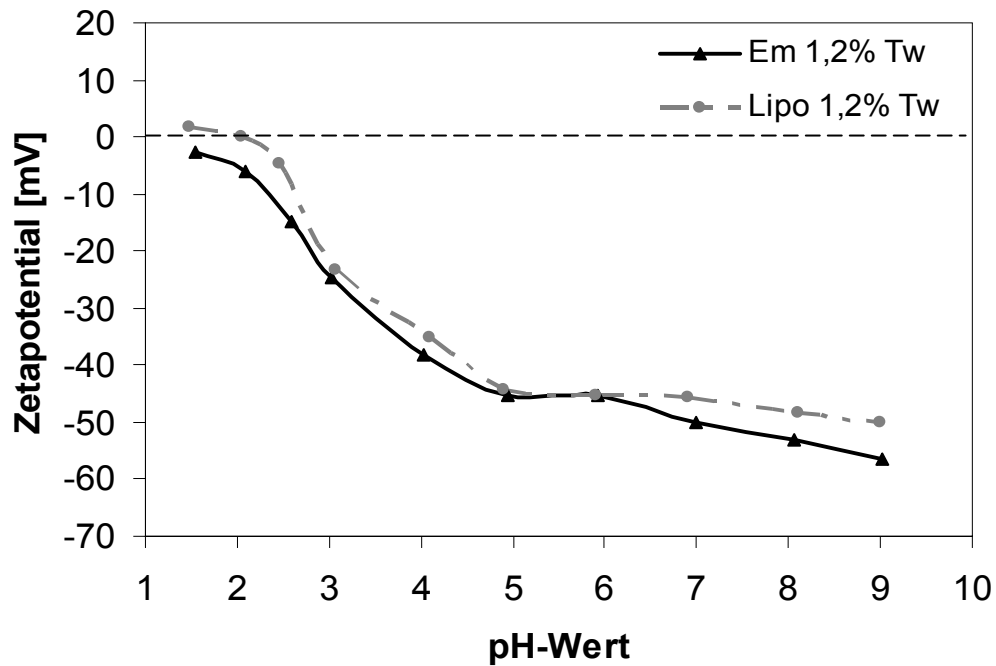


Abb. 4-23b: Zetapotential-pH-Profile der 1 mg/mL Amphotericin B-Emulsionen und deren Ausgangsemulsionen stabilisiert mit 1,2% Tween[®] 80 (oben) und einem Gemisch aus 10% DMPC + 90% Eilecithin (unten)

Abb. 4-23: Zetapotential-pH-Profile verschiedener Amphotericin B-Emulsionen (Em und G) und unbeladener Ausgangsemulsionen (Lipo und BL); die Stabilisierung erfolgte mit 0,8% Eilecithin, (0,8%), 1,2% Sojalecithin (S 1,2%), 1,2% Tween[®] 80 (1,2% Tw) und einem Gemisch aus 10% DMPC + 90% Eilecithin (Gesamtgehalt 1,2% Lecithin: G und BL, vgl. Tab. 4-8).

In einem pH-Bereich zwischen 1,5 und 2,5 lag der „Point of Zero Charge“. Die Emulsionen waren unterhalb von pH 2,5 positiv geladen, oberhalb des Wertes negativ. Die negative Ladung stieg durch die zunehmende Ionisierung der Nebenkomponten des Lecithins. Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin übernehmen hier den größten Teil (Bangham, 1968; Davis, 1982). Durch Einarbeiten des Arzneistoffs kann das pH-Profil leichte Veränderungen zeigen. Die abgebildeten Profile zeigten im Falle der Einarbeitung von Amphotericin B in Eilecithin- oder Tween[®]-stabilisierte Emulsionen kaum eine Zetapotentialveränderungen und eine geringfügige Verschiebung zu geringeren Zetpotentials im Falle einer Stabilisierung mit Sojalecithin oder teilhydrierten Lecithinen. Je basischer der pH-Wert, desto höher war das Zetapotential. Obwohl Tween[®] 80 ein sterischer Stabilisator ist und keine pH-abhängig dissoziierten Gruppen aufweist, zeigten die Emulsionen in der obigen Zusammensetzung ein pH-abhängiges Zetapotential. Die Messungen aus dem Rezeptur-screening zeigten, dass durch das Einarbeiten von Amphotericin B eine leichte Abnahme des Zetapotentials zu verzeichnen war, die Werte aber noch im stabilen Bereich lagen. Durch die Einlagerung des amphiphilen Arzneistoffs musste von einer geringen Stabilitätsabnahme ausgegangen werden, die aber i. A. ohne erkennbare Auswirkung blieb. Die Einlagerung führt zu einer leichten Veränderung des Monolayers. Oberhalb des Betrages von 40 mV stellte sich bei allen Emulsionen ein Plateau ein. Erfahrungswerte mit Lecithin stabilisierten Emulsionen zur parenteralen Ernährung zeigen, dass ein Minimum von 30 mV für stabile Emulsionen benötigt wird, bei ausreichender Festigkeit des Emulgatorfilms (Müller, 1996a). Parenterale Emulsionen weisen nach Herstellung einen pH-Wert von 6,5-8,7 auf. Mit Amphotericin B-beladene Emulsionen liegen ungefähr zwischen pH 6 und 7. Diese pH-Verschiebung wird nicht unbedingt durch den Arzneistoff verursacht, sondern durch die Aufnahme von CO₂ aus der Luft während der Produktion. Nach Lagerung kann der pH-Wert bis auf pH 4 abfallen (s. Kap. 4.5.3 und 4.5.5). Die untersuchten Systeme zeigen in den pH-Bereichen zwischen 4 und 9 ein ausreichend hohes Zetapotential. Zur Erhöhung der physikalischen Stabilität von Seiten der elektrostatischen Stabilisierung wäre es wünschenswert, auch bei Lagerung einen pH-Wert von ungefähr 7 beizubehalten. Zu lecithinstabilisierten parenteralen Emulsionen wird bei der Herstellung ein Zusatz von NaOH, Natriumoleat oder ein Gemisch aus diesen Substanzen gegeben. Dadurch soll der pH-Wert der Emulsionen erhöht werden. Zusätzlich werden neue geladene Komponenten im Tensidfilm durch Bildung von Salzen der freien Fettsäuren erzeugt und es kommt zu einer zusätzlichen Zetapotentialerhöhung (Bock et al., 1994). Dieser Vorgang kann auch bei der Lagerung von Emulsionen beobachtet werden (s.

Kap. 4.5.3 und 4.5.5). Mit fortschreitender Zeit stieg das Zetapotential. Ein zu niedriges Zetapotential wird bei den Ausgangs- und den beladenen Emulsionen daher nicht auftreten.

4.3 Amphotericin B, inkorporiert in handelsübliche parenterale Emulsionen

Intralipid[®] war das erste Handelspräparat einer Fettemulsion für die parenterale Anwendung (Schubert and Wretling, 1961). Daher wurden viele Versuche, Amphotericin B in Fettemulsionen zu inkorporieren, mit Intralipid[®] durchgeführt. Vereinzelt wurde auch Lipofundin[®] untersucht. Mittlerweile sind einige in ihrer Zusammensetzung sich unterscheidende Fettemulsionen im Handel und besitzen möglicherweise mehr Potential als Amphotericin B-Träger.

Die Emulsionen wurden von den Herstellerfirmen bezogen, um sie auf ihre Anwendbarkeit zur Einlagerung von Amphotericin B mittels Hochdruckhomogenisation zu testen. Die Zusammensetzung der Emulsionen ist in der Tabelle 4-9 aufgeführt. Die Eigenschaften der Öle sind ausführlich in Kapitel 1.1 beschrieben. Die käuflichen Fettemulsionen enthielten einen Fettanteil von 10 oder 20%. Als Emulgatoren wurden in den untersuchten Emulsionen ausschließlich Lecithine aus Ei in Konzentrationen von 0,6-2,5% eingesetzt, mit einem Mindestgehalt von 60-81% (3-sn-Phosphatidyl)cholin. 10%ige Fettemulsionen werden meist mit einem Gehalt von 0,6-1,2% Eilecithin stabilisiert. Auffällig ist hier die Stabilisierung mit 2,5% Lecithin der Fettemulsion mit Hochseefischöl. Die 20%igen Emulsionen wiesen einen Lecithingehalt von 1,2% auf. Alle Emulsionen enthalten zur Isotonisierung einen Glycerolanteil von 2,2-2,5%. Natriumoleat oder eine Kombination aus Natriumoleat und Natriumhydroxid diente zur pH-Einstellung der Emulsionen, Tocopherol als Antioxidans (Omegaven[®] und Lipofundin[®]).

Die Partikelgrößen der Ausgangsemulsionen können der Tabelle 4-9 entnommen werden. Die d_{50%}-Werte der 10%igen Emulsionen lagen zwischen 156 und 303 nm, die der 20%igen Fettemulsionen zwischen 274 und 348 nm. Die d_{99%}-Werte der 10%igen Emulsionen variierten zwischen 340 und 542 nm, die der 20%igen Fettemulsionen zwischen 422 und 576 nm. Die geringsten LD-Werte wurden für Omegaven[®]-Fresenius gemessen, der Emulsion mit 10% Öl aus Hochseefischen und 2,5% Lecithin. Die größten Partikel (LD) zeigten Lipofundin[®] 20% N (LCT) und Structolipid[®] 20% (strukturierte Triglyceride), wobei die PCS-Durchmesser der 20%igen Emulsionen kaum Unterschiede zeigten. Bei den 10%igen

Fettemulsionen zeigten Emulsionen aus LCT und 0,6% Lecithin sowohl den kleinsten PCS-Wert von 220 nm (Intralipid® 10) als auch den größten Wert von 300 nm (Lipovenös® 10% PLR). Die Unterschiede einiger formulierungsgleicher Emulsionen können möglicherweise mit unterschiedlichen Herstellungs- und Transportbedingungen oder einem unterschiedlichen Alter der Emulsionen erklärt werden. Lipofundin® 20% N war die einzige Emulsion, bei der die Haltbarkeit zum Zeitpunkt der Untersuchungen um 18 Monate überschritten war.

Tab. 4-9: Zusammensetzung und Partikelgröße handelsüblicher Fettemulsionen für die parenterale Ernährung vor der Beladung mit Amphotericin B

Tab. 4-9a: Parenterale Fettemulsionen mit 10% Fettgehalt

Produktname	Ölphase	Eilecithin [%]	Formulierung	d50% [μm]	d99% [μm]	PCS [nm]	PI
Lipovenös® MCT 10%	LCT/MCT	0,6	LVM 10	0,263	0,471	254	0,064
Lipofundin® MCT 10%	LCT/MCT	0,8	LFM 10	0,298	0,520	255	0,124
Lipovenös® 10% PLR*	LCT	0,6	LVP	0,302	0,536	300	0,070
Lipofundin® 10% N	LCT	0,8	LFN 10	0,303	0,542	274	0,214
Intralipid® 10	LCT	0,6	IL 10	0,282	0,500	220	0,178
Salvilipid® 10	LCT	1,2	SL 10	0,246	0,471	258	0,069
Abbolipid® 10%	LCT/Distelöl	0,74	AL 10	0,267	0,488	272	0,109
Omegaven® - Fresenius	Hochseefischöl	2,5	OM	0,156	0,340	228	0,046

* PLR phospholipidreduziert

Tab. 4-9b: Parenterale Fettemulsionen mit 20% Fettgehalt

Produktname	Ölphase	Eilecithin [%]	Formulierung	d50% [μm]	d99% [μm]	PCS [nm]	PI
Lipovenös [®] MCT 20%	LCT/MCT	1,2	LVM 20	0,300	0,487	281	0,128
Lipofundin [®] MCT 20%	LCT/MCT	1,2	LFM 20	0,274	0,475	275	0,106
Lipovenös [®] 20%	LCT	1,2	LV	0,309	0,422	287	0,151
Lipofundin [®] 20% N	LCT	1,2	LFN 20	0,336	0,576	297	0,147
Intralipid [®] 20	LCT	1,2	IL 20	0,321	0,538	285	0,214
Salvilipid [®] 20	LCT	1,2	SL 20	0,314	0,508	295	0,117
Structolipid [®] 20%	Strukturierte Triglyceride*	1,2	STL	0,348	0,553	298	0,081
Abbolipid [®] 20%	LCT/Distelöl	1,2	AL 20	0,311	0,522	294	0,205
Clin Oleic [®] 20%	Olivenöl/LCT (80:20)	1,2	CO	0,317	0,507	293	0,139

* Glyceroltri(alkanoat, alkenoat, C8-C18)

Nach der Homogenisation und Beladung der Emulsionen mit Amphotericin B konnten alle Emulsionen in ihrer Partikelgröße reduziert werden (vgl. Abb. 4-24, n = 2). Die LD 50%-Durchmesser lagen in einem Bereich von 115-171 nm. Es wurden keine Partikel größer als 500 nm detektiert. Wie in vorherigen Studien beobachtet wurde, wirkte sich ein Lecithingehalt von 0,6% nachteilig auf die Partikelgröße aus (LVM 10, LVP, IL 10). Die PCS-Durchmesser variierten zwischen 168 und 224 nm mit beladener Omegaven[®]-Fresenius als kleinster Amphotericin B-Emulsion und mit beladener Intralipid[®] 10% als größter Emulsion. Durch den doppelten Fettgehalt waren die Tröpfchengrößen der beladenen 20% Fettemulsionen in der Regel etwas größer. Die kleinsten Partikel zeigte hier Lipovenös[®] MCT 20% (d50%: 137 nm, d99%: 315 nm, PCS: 214 nm, PI: 0,172). Am größten waren die Partikel der Emulsionen mit LCT als Fettphase, stabilisiert durch 1,2% Lecithin (LV, LFN 20, IL 20 und SL 20). Die d50%-Werte variierten zwischen 181 und 226 nm und die d99%-Werte zwischen 446 und 493 nm. Die PCS-Daten lagen zwischen 214 (Lipovenös[®] MCT 20%) und 228 nm (Lipofundin[®] 20% N) mit einem PI von 0,10-0,17, was auf enge Partikelverteilungen aller Emulsionen hinweist. Die Emulsionen konnten alle mit Amphotericin B beladen werden. Die Emulsionen wurden unter polarisiertem Licht mit einem Mikroskop betrachtet. Auch dort waren keine Kristalle oder größere Partikel zu erkennen.

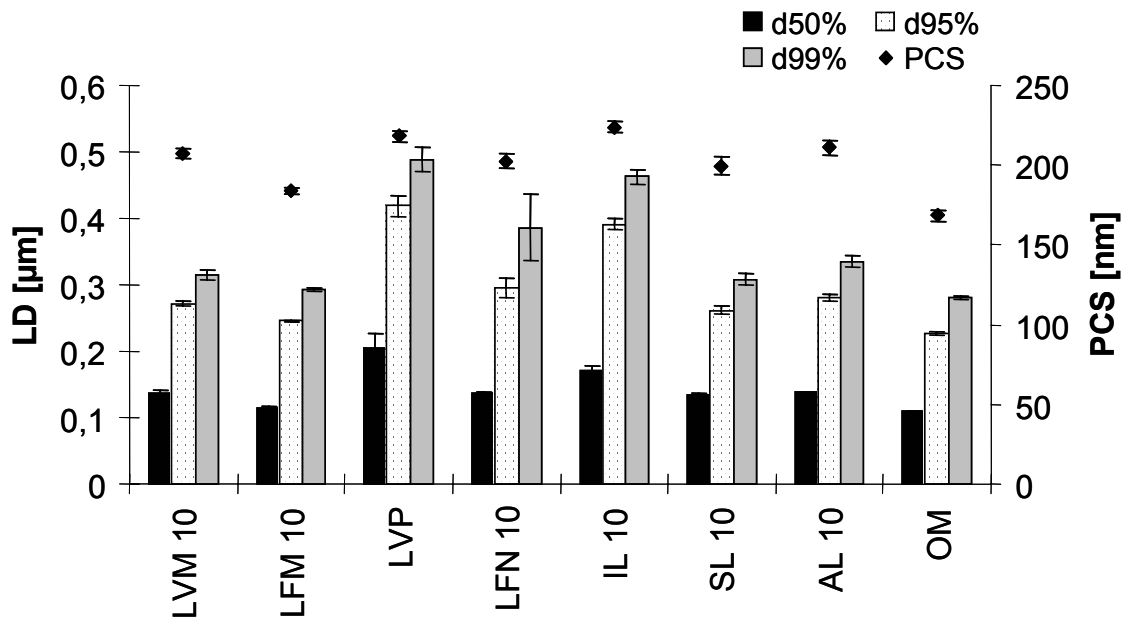


Abb. 4-24a: Fettemulsionen mit 10% Fettgehalt

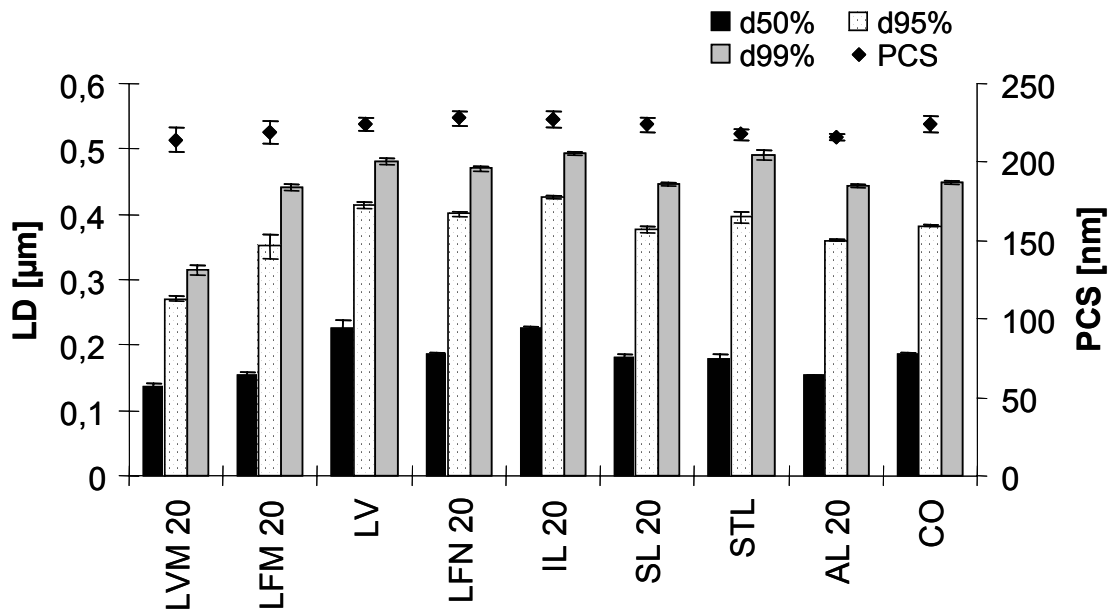


Abb. 4-24b: Fettemulsionen mit 20% Fettgehalt

Abb. 4-24: LD- und PCS-Daten der beladenen Fettemulsionen (1 mg/mL Amphotericin B, 600 bar, 45 °C, 10 Zyklen)

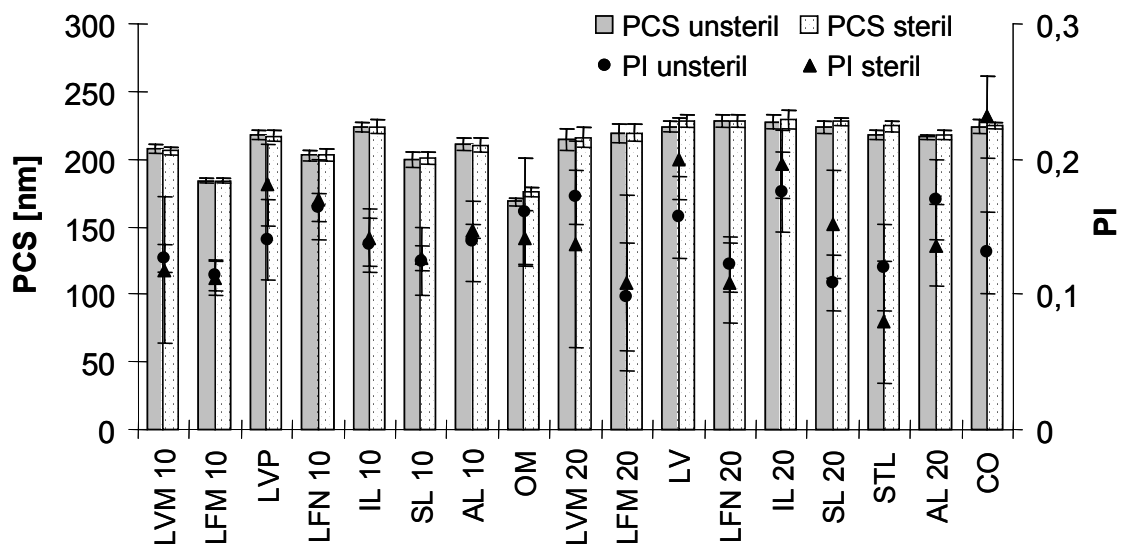


Abb. 4-25: Partikelgröße (PCS) der Proben vor und nach Sterilisation mittels PCS, 1 mg/mL Amphotericin B, eingearbeitet in handelsübliche Fettemulsionen (Abkürzungen s. Tab. 4-9, n = 2)

Anschließend wurden die Emulsionen unter Standardbedingungen autoklaviert und sowohl mit LD als auch mit PCS vermessen. Die PCS-Daten sind in Abbildung 4-25 graphisch veranschaulicht. Nach der Hitzebelastung zeichneten sich alle Emulsionen durch eine gute physikalische Stabilität aus. Eine geringere Autoklavierstabilität der Emulsionen mit 0,6% Eilecithin wurde hier nicht beobachtet (vgl. Kap. 4.1.3). Vor- oder Nachteile der unterschiedlichen Zusammensetzung der Emulsionen konnten so nicht ermittelt werden.

Ganz anders sahen die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen aus. Die Tabelle 4-10 zeigt die Ergebnisse vor Sterilisation.

Tab. 4-10: Gehaltsbestimmung vor der Dampfdrucksterilisation

Formulierung	unsteril [mg/mL]	Formulierung	unsteril [mg/mL]
LVM 10	0,918 ± 0,016	LVM 20	0,974 ± 0,016
LFM 10	0,915 ± 0,032	LFM 20	0,960 ± 0,050
LVP	0,589 ± 0,003	LV	0,788 ± 0,055
LFN 10	0,906 ± 0,032	LFN 20	0,929 ± 0,027
IL 10	0,699 ± 0,020	IL 20	0,941 ± 0,042
SL 10	0,551 ± 0,069	SL 20	0,893 ± 0,038
AL 10	0,469 ± 0,060	STL	0,945 ± 0,069
OM	0,730 ± 0,022	AL 20	0,797 ± 0,084
-	-	CO	0,754 ± 0,110

Die meisten Emulsionen zeigten einen Tag nach der Herstellung (vor Sterilisation) einen Gehalt zwischen 0,89 und 1,00 mg/mL (guter Gehalt, in der Abb. 4-26 durch graue Balken gekennzeichnet). Die Emulsionen, die einen mittleren Gehalt zwischen 0,70 und 0,80 mg/mL aufwiesen, sind im Diagramm schraffiert, und Emulsionen, die nur einen Gehalt zwischen 0,47 und 0,59 mg/mL zeigten, sind schwarz markiert. Bei den 10%igen Emulsionen wurden unabhängig von der Lecithinkonzentration bessere Beladungseigenschaften in einem LCT/MCT-Gemisch beobachtet als bei den Emulsionen, die nur LCT, LCT in einem Gemisch mit Distelöl oder ausschließlich Fischöl enthielten. Emulsionen mit einem Fettgehalt von 20% zeigten aufgrund des doppelten Fettanteils einen geringfügig besseren Gehalt an Amphotericin B. Auffällig sind die unterschiedlichen Ergebnisse der formulierungsgleichen Emulsionen. Schmidt (2002) konnte zeigen, dass die Löslichkeit von Amphotericin B in reinem Öl mehr als unzureichend ist, reines LCT im Gegensatz zu Olivenöl, Distelöl und MCT jedoch bessere Lösungseigenschaften aufweist (vgl. auch Löslichkeitsuntersuchungen, Kapitel 4.6). Da Amphotericin B sich vorwiegend in der Lecithinschicht löst sind die geringfügigen Löslichkeitsunterschiede in den jeweiligen Ölen nicht der einzige Grund für die obigen Ergebnisse. Vielmehr ist ein Zusammenspiel aller Komponenten (Prozessparameter und physikalische-chemische Eigenschaften der Substanzen) ausschlaggebend für das Einlagerungsvermögen von Amphotericin B.

Nach Sterilisation der Emulsionen in einem nicht rotierenden Autoklav unter Standardbedingungen wurde noch deutlicher, dass nicht alle Emulsionen als gute Amphotericin B-Träger geeignet sind (Abb. 4-26).

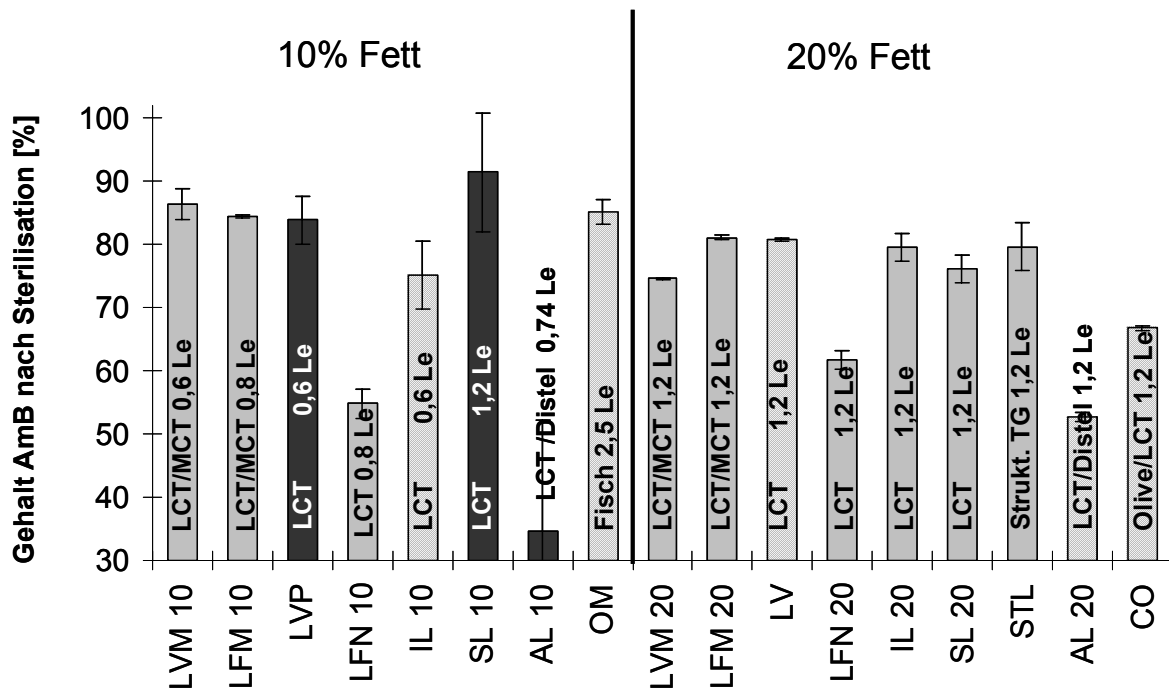


Abb. 4-26: Gehalt an Amphotericin B nach Sterilisation der beladenen handelsüblichen Emulsionen (in den Balken sind die Fettkomponente und die Lecithinkonzentration angegeben; schwarz = schlechte Beladung vor Sterilisation, schraffiert = mittlere Beladung vor Sterilisation und grau = gute Beladung vor Sterilisation)

Das beste Ergebnis mit einem Amphotericin B-Gehalt von 91,4% zeigte die 10%ige Salvilipid[®] Emulsion (LCT, 1,2% Lecithin), obwohl der Gehalt vor der Sterilisation mit $0,55 \pm 0,07$ mg/mL sehr niedrig war. Die 20%ige Salvilipid[®]-Emulsion zeigte hingegen nur einen Gehalt von 76,2%. Hier hat womöglich das bereits abgebaute Amphotericin B einen Schutzfilm erzeugt, der einem erneuten oxidativen Angriff vorbeugt. Der geringste Amphotericin B-Gehalt wurde bei den Abbolipid[®]-Emulsionen gefunden. Abbolipid[®] 10% zeigte nach schlechtem Anfangsgehalt nach der Sterilisation nur noch einen Gehalt von 34,6% und Abbolipid[®] 20% von 52,6%. Ein zu hoher Gehalt an ungesättigten Fettsäuren scheint die Stabilität der Einlagerung negativ zu beeinflussen. Bei den 10%igen Emulsionen ergab Omegaven trotz eines mittleren Gehalts nach Sterilisation ein Ergebnis von 85%, der mit den beiden LCT/MCT-Emulsionen zwischen 84,5 und 86,4% gleichzusetzen war. Die in Kapitel 4.1.3 beobachtete starke Zersetzung des Amphotericin B in einer 10%igen MCT/LCT-Emulsion mit 0,6% Lecithin konnte hier nicht bestätigt werden. Die 20%igen Emulsionen lagen nach der Sterilisation in einem Bereich zwischen 53,6% (Abbolipid[®] 20%) und 81,1% (Lipofundin[®] MCT 20%) und damit leicht unter den Ergebnissen der 10%igen

Emulsionen Die 20%igen rezepturgleichen LCT-Emulsionen wiesen einen Restgehalt zwischen 61,7-80,8% auf, mit Lipofundin® 20% N als schlechtester und ältester Emulsion.

Die Emulsionen mit unterschiedlicher Zusammensetzung zeigten erhebliche Unterschiede in ihrem Verhalten als beladene Amphotericin B-Emulsion. Physikalisch schienen alle Emulsionen vor und nach Sterilisation als Träger geeignet zu sein. Die Amphotericin B-Gehaltsbestimmung hingegen machte deutlich, dass sich die Emulsionen sehr unterschiedlich verhielten. Der Ölkern der Emulsionstropfen übt, neben dem Emulgator, vermutlich auch einen Einfluss auf die Einlagerung von Amphotericin B aus. Betrachtet man den Amphotericin B-Gehalt vor und nach Sterilisation, wiesen die 10%igen Emulsionen mit einem Gemisch von LCT und MCT die besten Eigenschaften auf. Abgesehen von einer geringeren Einlagerungsstabilität während der Produktion und Lagerung bei Raumtemperatur, schützte die Emulsion mit 10% LCT, stabilisiert mit 1,2% Lecithin, am besten den Arzneistoff vor Hitzeeinwirkung.

Aus physiologischen Überlegungen (geringere Beeinträchtigung des Immunsystems) reduzierte Schmidt in den Emulsionen den Fettanteil von 20 auf 10%. Durch den Vergleich handelsüblicher Emulsionen bestätigte sich die Wahl einer 10%igen MCT/LCT-Emulsion als Basis für die Amphotericin B-haltige Emulsion. Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse bei gleicher Zusammensetzung kann nur in unterschiedlichen industriellen Herstellungsparametern der Ausgangsemulsionen, in den unterschiedlichen Transport- und Lagerungsbedingungen oder dem Alter der Emulsionen zu finden sein. Um dies zu klären und Schwankungen im eigenen Herstellungsprozess auszuschließen, wäre eine erneute Herstellung der Amphotericin B-Emulsionen mit einer höheren Chargenanzahl erforderlich.

4.4 In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen

4.4.1 Vergleich der Wirksamkeit von Amphotericin B in einer sterilen und unsterilen Emulsion

In einem Vorversuch wurde eine Emulsion nach Standardbedingungen aus Lipofundin[®] MCT 10% hergestellt, eine Hälfte der Dampfdrucksterilisation unterzogen und beide Proben auf ihre Wirksamkeit gegenüber Amphotericin B-Trockensubstanz (= Fungizone[®]) getestet (n = 1). Eingesetzt wurde ein Candida albicans Pilzstamm.

Die MFK (**minimale fungizide Konzentration**) der unsterilen Emulsion entsprach in etwa der MFK der Vergleichssubstanz Amphotericin B Trockensubstanz (1,37 mg/mL vs. 1,25 mg/mL nach 3 h und 0,34 mg/mL vs. 0,62 mg/mL nach 24 h). MFK wird hier definiert als die geringste getestete Wirkkonzentration von Amphotericin B, die eine vollständige Pilzabtötung bewirkte. Beim Einarbeiten von Amphotericin B in die parenterale Fettemulsion war kein Wirkungsverlust in vitro eingetreten (Emulsion unsteril). Die MFK der sterilen Emulsion war ca. 3,6 fach höher, sowohl nach 3 h (4,5 mg/mL) als auch 24 h (2,25 mg/mL) nach Inkubation. Dieser Wirkungsverlust gegenüber Amphotericin B-Trockensubstanz ist aber nicht als dramatisch einzuschätzen. Es konnte somit bestätigt werden, dass kein Wirkungsverlust des Amphotericin B beim Einarbeiten in die Fettemulsion und während der anschließenden Sterilisation eintritt.

Gerade bei Emulsionsformulierung könnte eine Minderung der Toxizität erwartet werden. Da bekanntermaßen In-vitro-Ergebnisse nur eingeschränkt Wirkungen in vivo vorhersagen, wurden Untersuchungen im Tier angeschlossen.

4.4.2 In-vitro-Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit

Geprüft wurden 2 Emulsionen mit einer Beladung von 1 mg/mL Amphotericin B: LFM 10 (Lipofundin[®] MCT 10%, 0,8% Eilecithin) und LFM 20 (Lipofundin[®] MCT 20%, 1,2% Eilecithin). Zum Vergleich wurden Amphotericin B Trockensubstanz[®] (Fungizone[®]) und liposomales Amphotericin B (AmBisome[®]) herangezogen.

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) erfolgte als Endpunktbestimmung im Mikrodilutionsverfahren (Deutsche Gesellschaft für Hygiene and Mikrobiologie, 1991) nach NCCLS-Standard. Der Referenzstamm C. krusei ATCC6258 lag im geforderten Bereich. Der Test wurde mit dem Stamm ATCC10231 innerhalb von 14

Tagen mehrfach wiederholt, mit Einzelergebnissen, die maximal um eine Verdünnungsstufe voneinander abwichen, so dass von der Stabilität der Gemische LFM 10 und LFM 20 innerhalb dieses Zeitraumes ausgegangen werden konnte. Die Ergebnisse sind als MHK in mg Amphotericin B pro Liter der jeweiligen Formulierung in der Tabelle 4-11 dargestellt.

Tab. 4-11: MHK verschiedener Amphotericin B-Formulierungen: Amphotericin B Pulver (Fungizone®), liposomales Amphotericin B (AmBisome®), LFM 10 (1 mg/mL Amphotericin B, Lipofundin® MCT 10%, 0,8% Eilecithin) und LFM 20 (1 mg/mL Amphotericin B, Lipofundin® MCT 20%, 1,2% Eilecithin)

	Fungizone® [mg/L]	AmBisome® [mg/L]	LFM 10 [mg/L]	LFM 20 [mg/L]
C.albicans ATCC10231	0,0312	0,125	0,0625	0,0625
	0,0625	0,125	0,0625	0,0625
	0,0625	0,125	0,0625	0,0625
	0,0625	0,125	0,0625	0,0625
	0,0625	0,125	0,0625	0,0625
	0,0625	0,125	0,125	0,125
	0,0625	0,125	0,125	0,125
C.krusei ATCC6258	0,5	2,0	1,0	1,0
	0,5	2,0	1,0	1,0
C.glabrata DSM6425	0,125	0,250	0,250	0,125
C.tropicalis ATCC13803	0,125	0,125	0,125	0,125
P.guilliermondii ATCC6260	0,125	0,250	0,125	0,125
C.parapsilosis DSM4238	0,0625	0,125	0,125	0,125

Die MHK-Werte beider Emulsionen wichen von denen der Vergleichssubstanz Fungizone® höchstens um eine Verdünnungsstufe ab, so dass vermutet werden konnte, dass in vitro bei einer Einwirkzeit von 24 h kein Wirkungsverlust von Amphotericin B in LFM 10 und LFM 20 auftritt. Dies galt für alle getesteten Stämme.

Der Vergleich der Fungizidie-Kinetiken erfolgte mit einem der MHK-Bestimmung entsprechenden Testansatz im Makrodilutionsverfahren mit dem Stamm *Candida albicans* ATCC10231. Amphotericin B lag bei den zu vergleichenden Präparaten jeweils in den Konzentrationen 5 mg/L, 1,25 mg/L und 0,312 mg/L vor. Die Wachstumskontrollen für LFM 10 und LFM 20 enthielten die entsprechende Konzentration Lipofundin® MCT 10% bzw. MCT 20% ohne Wirkstoff. Die Inkubationszeiten betragen 2, 4, 6 und 24 h. Zu diesen Zeitpunkten wurden Aliquoten entnommen und darin die Zahl der lebenden,

vermehrungsfähigen Pilze als koloniebildende Einheiten (cfu) bestimmt. Die Ergebnisse der Fungizidie-Kinetiken sind in der Abbildung 4-27 und 4-28 dargestellt.

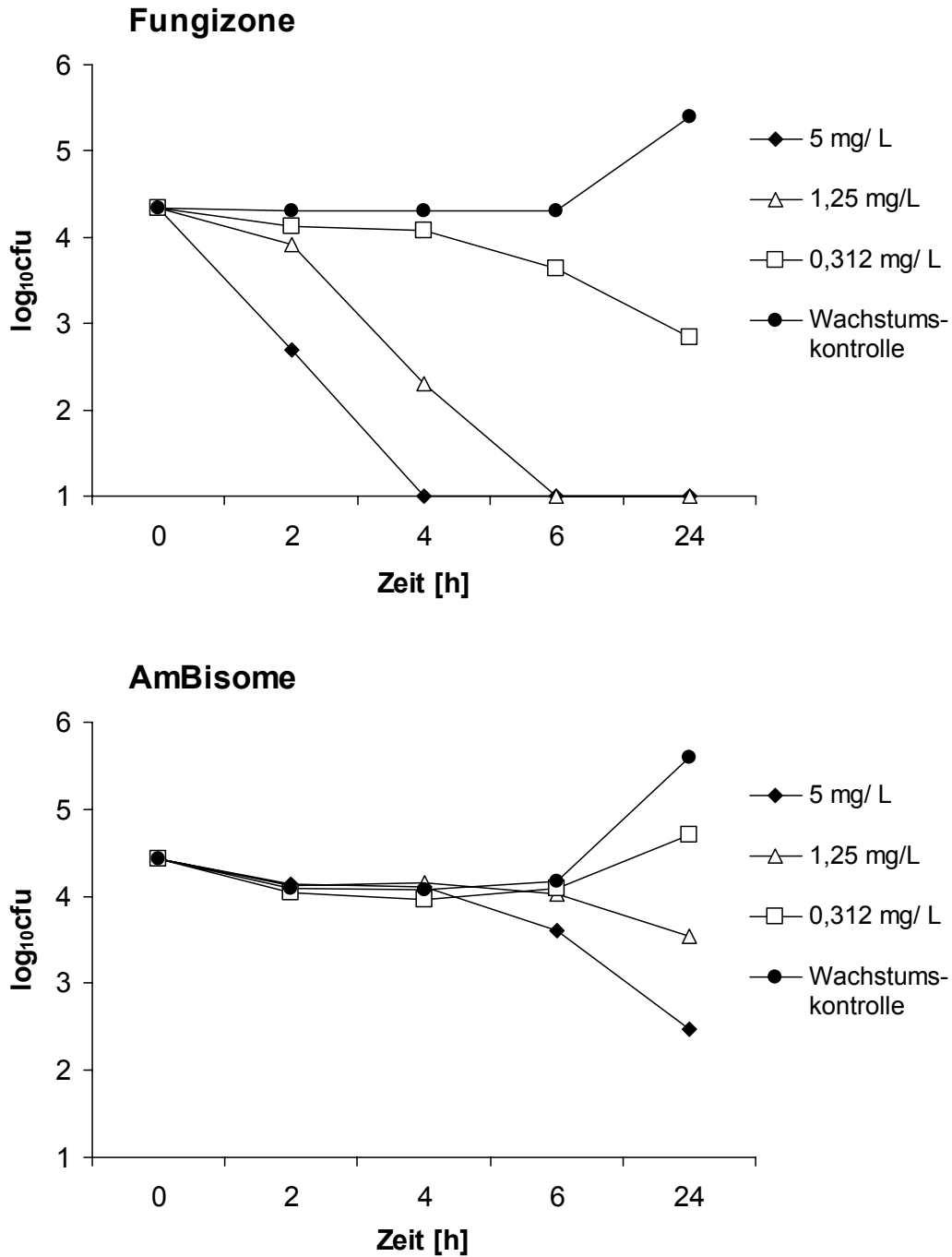


Abb. 4-27: Fungizidie-Kinetik von Fungizone[®] und AmBisome[®]

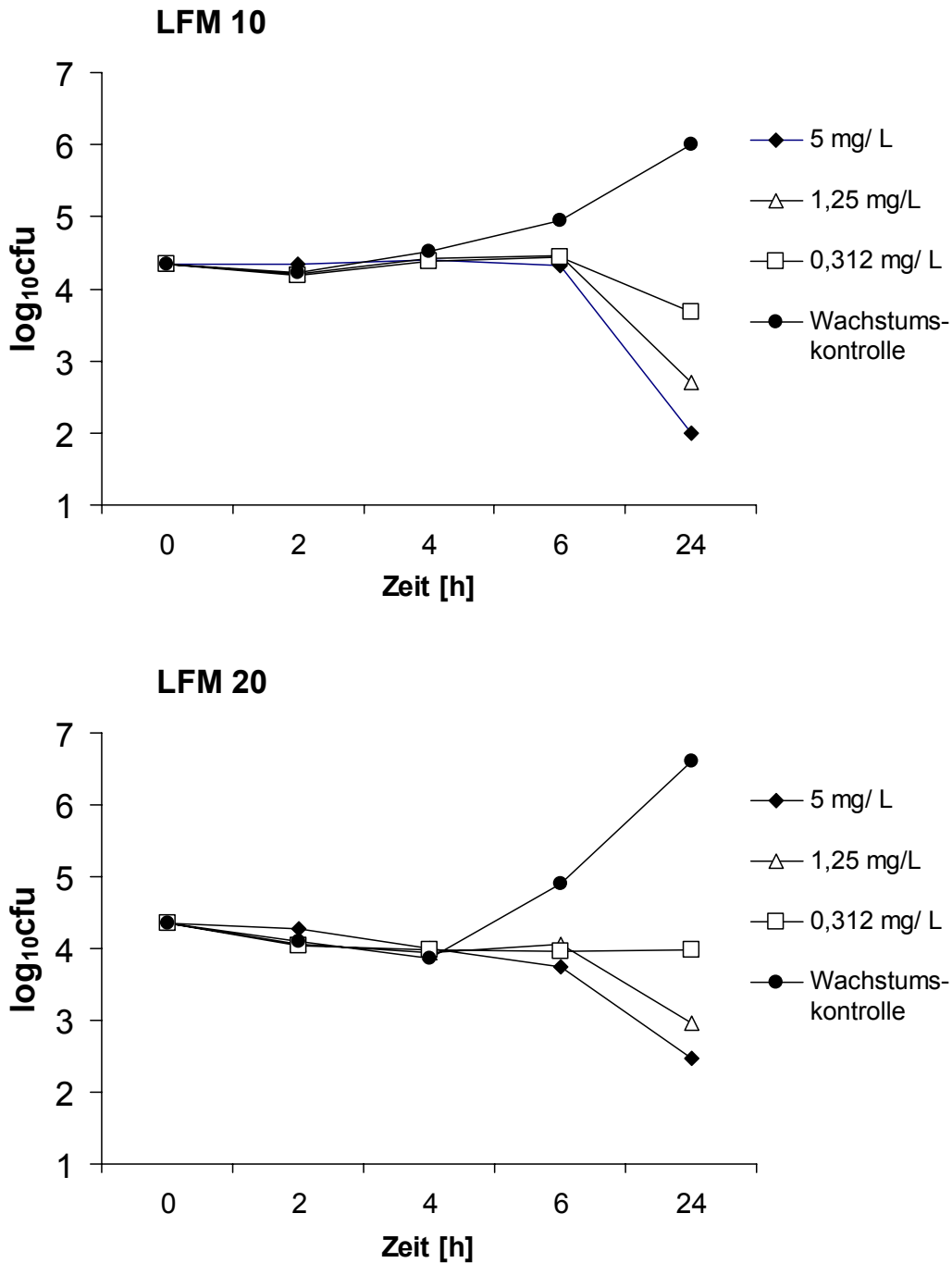


Abb. 4-28: Fungizidie-Kinetik der beladenen Emulsionen LFM 10 und LFM 20

Die Emulsionen LFM 10 und LFM 20 entsprachen in ihrer zeitabhängigen Wirkung auf den Teststamm in etwa der von AmBisome[®]. Innerhalb des Inkubationszeitraumes von 6 h war unter den gegebenen In-vitro-Verhältnissen bei Konzentrationen bis zur ca. 32fachen MHK eine Fungistase erfolgt anstelle der Fungizidie bei Einwirkung von Fungizone[®]. Ähnlich wie bei AmBisome[®] dürfte der In-vitro-Effekt bei LFM 10 und LFM 20 auf

"gebundenes" Amphotericin B zurückzuführen sein, welches nicht in direkten Kontakt mit den Pilzen im Medium kommt. Lipofundin[®] MCT im Testmedium hatte zudem einen das Pilzwachstum stimulierenden Effekt, Lipofundin[®] MCT 20% stärker als MCT 10%.

4.4.3 In-vivo-Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit

Balb/c Mäuse wurden intravenös subletal mit *Candida albicans* ATCC10231 infiziert. 24 h später begann die Therapie mit einer täglichen Dosis von 0,75 mg Amphotericin B pro kg KG, die ebenfalls intravenös verabreicht wurde. 24 h nach der 3. Therapie und 24 h nach der 7. Therapie wurden die Organe entnommen und die Keimzahlen bestimmt.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Keimzahlen der zu vergleichenden Gruppen wurden mit Hilfe des Tukey's Tests für multiple Vergleiche bei einem Signifikanzniveau von 0,05 ermittelt.

In der Leber entspricht die Wirkung von LFM 10 und LFM 20 am ehesten der von Fungizone[®] (vgl. Abb. 4-29). Mit den Emulsionen LFM 10 und LFM 20 konnten signifikante Reduktionen der Keimzahlen im Vergleich zu den nichttherapierten Kontrollen bereits nach dreimaliger Therapie erzielt werden. Der stärkste keimreduzierende Effekt in der Leber war mit AmBisome[®] erreichbar. Die Anreicherung von liposomalem Amphotericin B im RES ist beschrieben (Bekersky et al., 1999; Legrand et al., 1996; Mehta, 1997) und gilt als Ursache für die Konzentration und die Wirkung von AmBisome[®] auf Leber und Milz. In den Nieren war ein therapeutischer Effekt aller 4 Testsubstanzen erst bei einer Therapiedauer von einer Woche feststellbar. Eine signifikante Keimreduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe fand sich aber nur bei Therapie mit Fungizone[®] und LFM 10. Die Verlängerung der Therapiezeit von 3 auf 7 Tage war außerdem mit LFM 10 effektiver als mit LFM 20. Im Gehirn konnte mit keiner der 4 Testsubstanzen ein therapeutischer Effekt festgestellt werden.

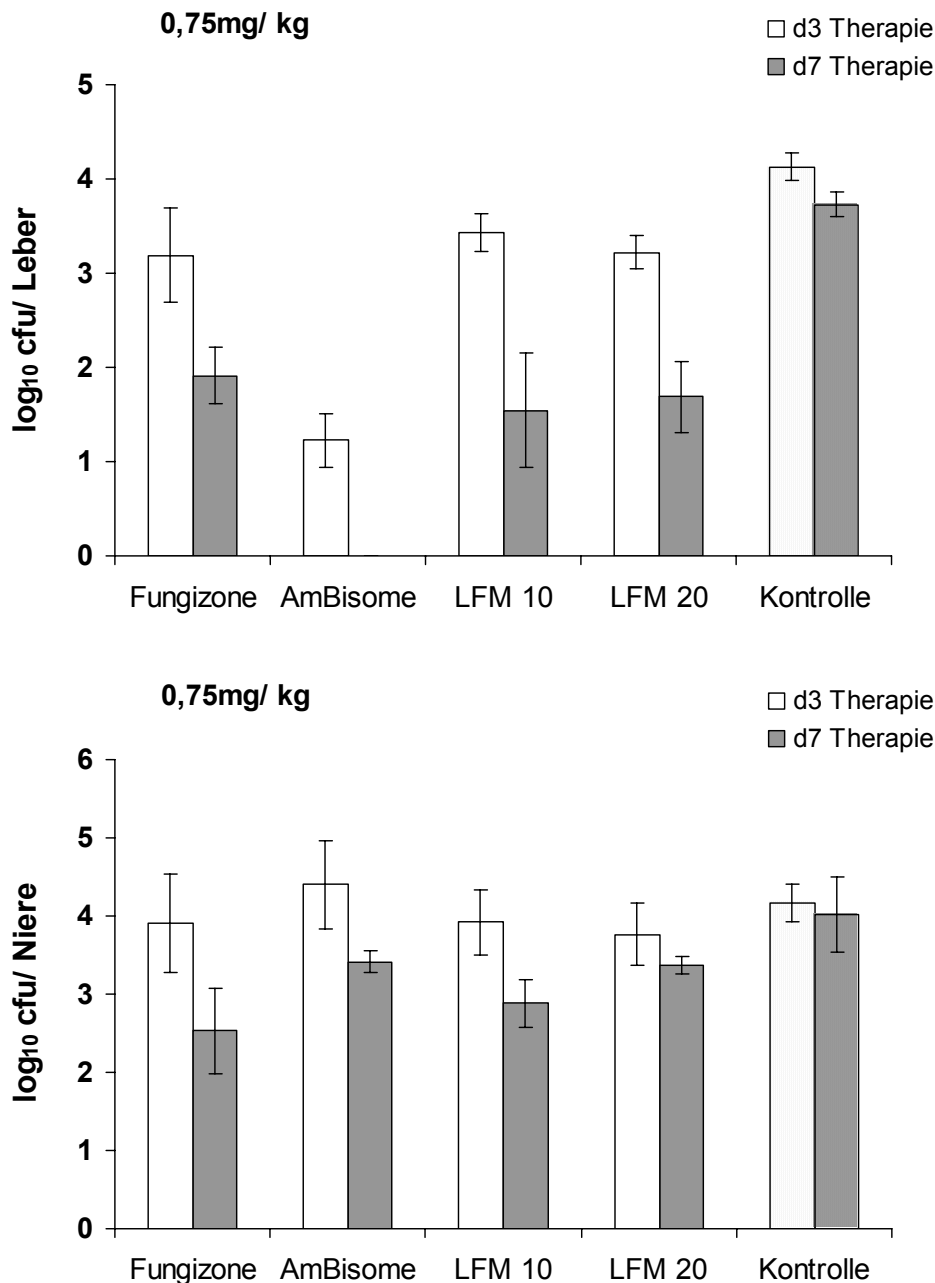


Abb. 4-29: Keimzahlen in Leber und Niere, Therapie mit 0,75 mg/kg KG pro Tag; Kontrolle: Lipofundin® MCT ohne Wirkstoff; pro Gruppe und Zeitpunkt n = 5.

In einem zweiten Versuch wurden die Tiere täglich entweder mit 0,75 mg oder mit 2 mg Amphotericin B pro kg KG drei Tage lang behandelt (vgl. Abb. 4-30). Die hohe Dosis von 2 mg wurde in Form von AmBisome®, LFM 10 und LFM 20 problemlos vertragen, nicht aber in Form von Fungizone®, weshalb Fungizone® nur in einer Dosis von 0,75 mg/kg KG verwendet wurde. Dosen von 5 mg/kg KG von LFM 10 und LFM 20 wurden von den frisch infizierten Tieren nicht vertragen, wohingegen AmBisome® problemlos in Dosen von 5 mg/kg und sogar 10 mg/kg KG toleriert wurde.

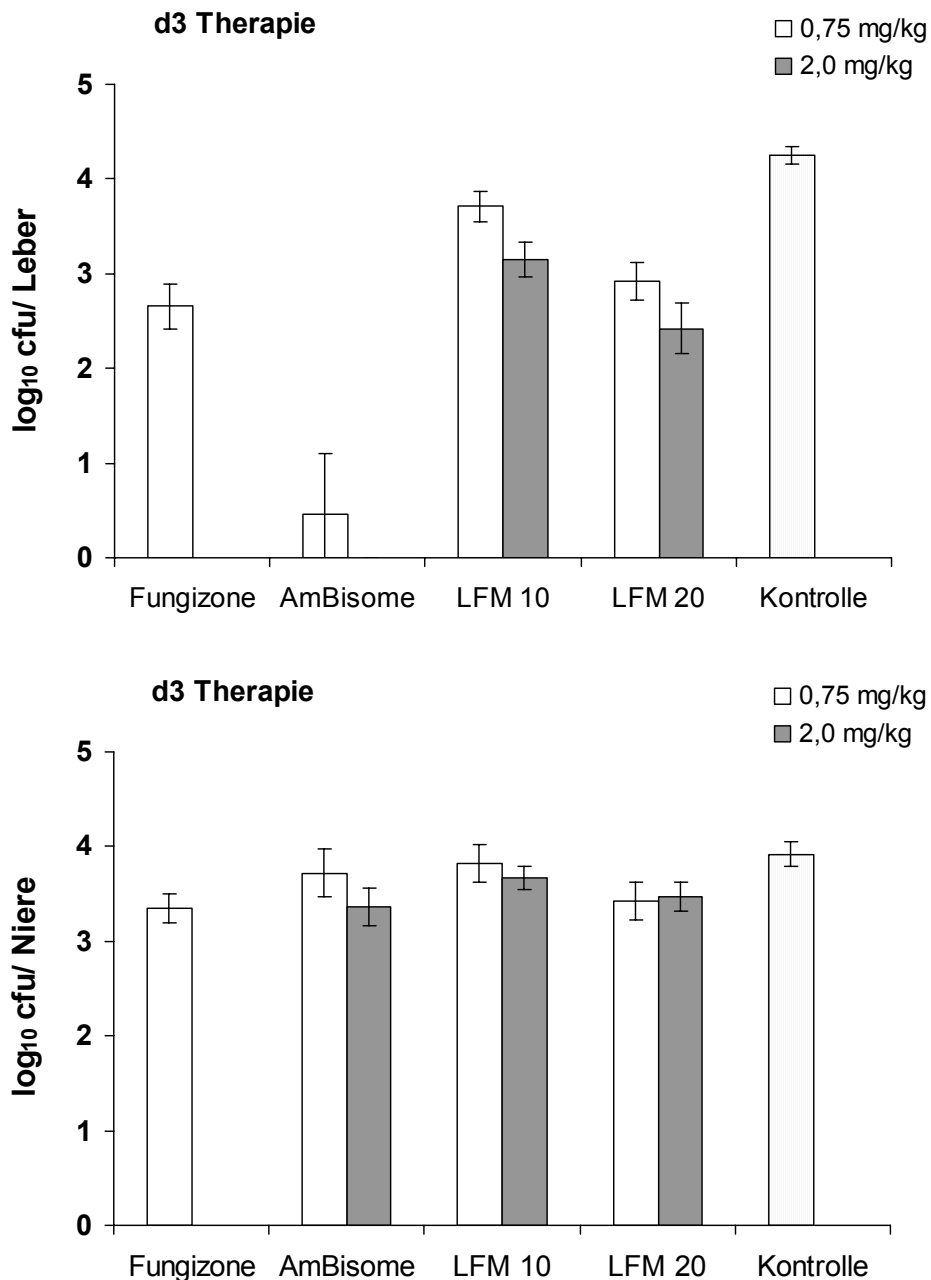


Abb. 4-30: Keimzahlen in Leber und Niere; Therapie mit 0,75 mg bzw. 2 mg Amphotericin B pro kg KG pro Tag; Kontrolle: keine spezifische Therapie; LFM 10 und LFM 20 (2 mg/kg KG): n = 8, AmBisome®: n = 6, alle anderen Gruppen n = 5.

Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Versuch nach Therapie mit einer Dosis von 0,75 mg/ kg KG konnten reproduziert werden, wobei jetzt eine stärkere keimreduzierende Wirkung von LFM 20 im Vergleich zu LFM 10 in der Leber deutlicher sichtbar wurde. Eine Dosissteigerung auf 2 mg führte bei beiden Emulsionen in der Leber zur weiteren Keimreduktion, die im Falle von LFM 10 im Vergleich zur niedrigeren Dosis signifikant war.

In der Niere trat in diesem Versuch bereits nach dreimaliger Therapie mit 0,75 mg/kg KG bei Fungizone[®] und LFM 20 ein signifikanter therapeutischer Effekt auf. Die Dosiserhöhung auf 2 mg bewirkte eine weitere, im Vergleich zur niedrigeren Dosis nichtsignifikante Reduktion der Keimzahlen in den mit AmBisome[®] und LFM 10 behandelten Gruppen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe waren mit 2 mg signifikante Keimzahlunterschiede bei Therapie mit AmBisome[®] und LFM 20 erreichbar. Im Gehirn fand sich mit keiner der 4 Testsubstanzen weder mit 0,75 noch bei einer Dosis von 2 mg/kg KG ein therapeutischer Effekt.

4.4.4 In-vivo-Untersuchungen der Akuttoxizität

Nichtinfizierte Balb/c Mäuse wurden einmalig mit steigenden Konzentrationen bis 10 mg Amphotericin B pro kg KG intravenös behandelt. Die Akuttoxizität der Formulierungen war am Versterben der Tiere kurz nach der Injektion zu erkennen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-12 dargestellt.

Tab. 4-12: Akuttoxizität

	0,75 mg/ kg KG	2 mg/ kg KG	5 mg/ kg KG	10 mg/ kg KG
Überleben [%]				
Fungizone [®]	100	0	nicht getestet	nicht getestet
AmBisome [®]	100	100	100	100
LFM 10	100	100	100	100
LFM 20	100	100	100	100

Die beiden Emulsionen wurden von nichtinfizierten Tieren auch in der Konzentration von 10 mg/kg KG vertragen, während bei Fungizone[®] die Dosis von 2 mg/kg KG bereits akut toxisch war.

4.4.5 Zusammenfassende Diskussion

Das Einarbeiten von Amphotericin B und das Autoklavieren der Emulsion führten zu keinem Wirkungsverlust.

In vitro fand sich bei LFM 10 (Standardrezeptur) und LFM 20 im Vergleich zu Fungizone[®] eine zeitlich verzögerte Wirkung auf Pilzzellen ähnlich wie bei AmBisome[®].

In vitro trat ein nicht regelmäßig nachweisbarer Wirkungsverlust von Amphotericin B in der Formulierung LFM 10 im Vergleich zu Fungizone[®] auf, der durch Dosissteigerung wieder ausgeglichen werden konnte. LFM 20 und LFM 10 zeigten in Leber und Niere einem dem Fungizone[®] vergleichbaren Effekt. Die in Tier- und Patientenstudien gesammelten Beobachtungen zu einer erhöhten oder gleichen Effektivität bei der Einarbeitung von Amphotericin B in parenterale Emulsionen bei verminderter Toxizität (Caillot et al., 1994; Chavanet et al., 1992; Heinemann et al., 1997; Johansen and Gotzsche, 2000) konnte in dieser Versuchsreihe bestätigt werden. Es kann von einer verminderten Toxizität ausgegangen werden. Weitere Studien hierzu müssen aber noch durchgeführt werden. Eine Therapieverlängerung von 3 auf 7 Tage erhöhte die Effektivität. Eine Dosissteigerung von 0,75 auf 2 mg/kg KG der lipidhaltigen Zubereitungen erhöhte ebenfalls die Wirksamkeit.

Eine ähnlich starke Keimreduktion in der Leber wie bei Therapie mit AmBisome[®] aufgrund der Anreicherung von liposomalem Amphotericin B in diesem Organ war für die Emulsionen LFM 10 und LFM 20 nicht nachweisbar. Bei AmBisome[®] dient die Leber zusätzlich als Depot. Im Gegensatz zu AmBisome[®] werden die Pharmakokinetik der Emulsionen verändert und ein höherer Blutspiegel zu erwarten sein. Diese Vermutung muss allerdings noch bestätigt werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden Shadkchan et al bei Amphotericin B-haltigen Emulsionen eine verstärkte Anreicherung in Leber und Milz, aber geringere Konzentrationen in Niere und Lunge (Shadkchan et al., 2003). Sievers et al. (1996) fassten die wenigen zu Fungizone[®] in Intralipid[®] vorhandenen Studien mit der Schlussfolgerung zusammen, dass eine Applikation vermutlich zu geringeren Amphotericin B-Konzentrationen als mit dem Standard Fungizone[®] führt.

Im ZNS konnte keine keimreduzierende Wirkung mit den Emulsionen und Vergleichssubstanzen nachgewiesen werden.

Die bekannte Akuttoxizität von Amphotericin B wurde bei Applikation von LFM 10, LFM 20 und AmBisome[®] in einer Dosis bis 10 mg/kg KG im nicht infizierten Tier nicht gesehen, weshalb eine Dosissteigerung von Amphotericin B in diesen Formulierungen mindestens auf

das 10fache der Konzentration von Fungizone[®] möglich war. Am ersten Tag nach der Infektion waren die Prüfsubstanzen LFM 10 und 20 jedoch auch in Konzentrationen von 5 mg/kg KG akut toxisch. AmBisome[®] wird vom akut infizierten Tier bis 10 mg/kg KG problemlos toleriert. Normalerweise wird AmBisome[®] in Dosierungen von 3-5 mg/mL KG eingesetzt. Eine Erhöhung der Dosen auf 7,5-15 mg/kg wurde als sicher eingestuft (Walsh et al., 1998).

Bei Lagerung der Prüfsubstanzen LFM 10 und LFM 20 bei 4 °C wurde im Untersuchungszeitraum von 3 Wochen keine sichtbare Entmischung festgestellt.

Zusammenfassend stellen die untersuchten Emulsionen eine Alternative zu dem sehr teuren AmBisome[®] dar. Weitere Untersuchungen zur Toxizität und Pharmakokinetik sind erforderlich und würden weitere Erkenntnisse zu diesem Trägersystem liefern.

4.5 Physikalische und chemische Stabilität bei Lagerung

Für die im Handel befindlichen industriell hergestellten parenteralen Emulsionen wird eine Laufzeit von 2 Jahren angestrebt (Schuhmann and Müller, 1994). Da die Emulsionen im Endbehältnis autoklaviert werden, sollte die Sterilität über diesen Zeitpunkt aufgrund der Vorbehandlungen gewährleistet sein. Kürzere Laufzeiten parenteraler Formulierungen könnten bei physikalischen und chemischen Instabilitäten nötig sein. Für die Applikation des späteren Arzneimittels ist die Garantie einer ausreichend langen Lagerzeit von Bedeutung. Die bisherigen Handelspräparate für Amphotericin B liegen als gefriergetrocknetes Pulver oder im Falle von Abelcet[®] als Suspension vor. Alle Produkte müssen vor Applikation weiter aufbereitet werden. In der Fertigung der Amphotericin B-Emulsion mittels Hochdruckhomogenisation wird ein ready-to-use-Produkt angestrebt. Eine geringe Laufzeit würde die bisherigen Vorteile dieses Produktes schmälern.

Die Stabilität der Nanosuspension spielte eine untergeordnete Rolle, da diese lediglich zur Einarbeitung des Arzneistoffes in die Emulsionen gedacht ist. Aggregation, Flockung und Sedimentation sind physikalisch zu berücksichtigen. Ein Partikelwachstum muss für parenterale Formulierungen möglichst gering gehalten werden; für eine orale Applikation wäre ein Anteil von Mikropartikeln unproblematisch. Vergleichende chemische Stabilität der verschiedenen beladenen Emulsionen liefert ein grundsätzliches Verständnis des Amphotericin B-Emulsions-Systems.

4.5.1 Physikalische Stabilität der Nanosuspensionen

Die Nanosuspensionen (2,5% Amphotericin B, 2,4% Eilecithin, 95,1% Wasser) wurden sterilisiert und unsterilisiert für einen Zeitraum von 6-12 Monaten bei Raumtemperatur (RT) und 4-8 °C (Kühlschrank, K) unter Lichtausschluss gelagert. Die Chargen wurden mit Stickstoff begast. Die Daten der physikalischen Stabilität können der Tabelle 4-13 entnommen werden.

Tab. 4-13: Langzeitstabilitäten der sterilisierten und unsterilisierten Nanosuspensionen bei Raumtemperatur (RT) und 4-8 °C (Kühlschrank, K)

Lagerung	Mess- parameter	Monat					
		0	1	2	3	6	12
RT	d50% [μm]	1,74	2,52	3,74	3,77	-	-
	d99% [μm]	4,59	5,06	9,18	9,46	-	-
	PCS [nm]	3337	2412	3326	2919	-	-
	PI	0,420	0,326	0,300	0,352	-	-
	pH	4,5	4,3	4,3	4,2	-	-
	ZP [mV]	-24,2	-25,6	-25,0	-23,2	-	-
4-8 °C	d50% [μm]	1,88	1,77	1,62	2,60	4,11	3,75
	d99% [μm]	4,64	3,60	3,45	6,52	22,31	22,26
	PCS [nm]	2640	1688	1463	2801	3095	3071
	PI	0,361	0,317	0,273	0,274	0,147	0,237
	pH	4,6	4,3	4,4	4,4	-	4,1
	ZP [mV]	-24,8	-17,7	-19,5	-24,3	-	-27,1
sterilisiert 4-8 °C	d50% [μm]	-	1,99	4,39	4,29	3,65	4,24
	d99% [μm]	-	3,75	10,39	11,54	10,61	12,21
	PCS [nm]	5896	3941	4356	2960	1803	3859
	PI	0,648	0,413	0,453	0,365	0,402	0,580
	pH	4,7	4,8	4,4	4,5	-	4,6
	ZP [mV]	-33,5	-21,0	-22,0	-23,4	-	-45,9

Bereits kurz nach der Herstellung bildeten sich aufschüttelbare Agglomerate. Durch das Autoklavieren nahm die Größe der Agglomerate zu. Nach Lagerung von Suspensionen kann es durch die *Ostwald-Reifung* zu einem Anstieg der Partikelgrößen kommen. Beim Stehenlassen eines kristallinen Niederschlages wachsen größere Teilchen bevorzugt auf Kosten der kleineren, die sich auflösen. Dieser Vorgang ist auf die größere Oberflächenenergie kleinerer Teilchen zurückzuführen. Über kleineren Partikeln herrscht eine höhere Sättigungskonzentration als über den größeren Partikeln. Daher diffundieren Moleküle aus dem höher konzentrierten Bereich zu dem niedriger konzentrierten Bereich über den großen Partikeln, wodurch dann lokal die Sättigungslöslichkeit überschritten wird und der

gelöste Arzneistoff an den großen Partikeln rekristallisiert. An den kleinen Partikeln wird hingegen die Sättigungslöslichkeit unterschritten und neuer Arzneistoff nachgelöst. Dies führt zur Auflösung der kleinen Partikel. In diesem Beispiel handelte es sich bei dem Anstieg der Partikelgrößen aber eher um eine weitere Aggregation der Partikel.

Innerhalb von einem Jahr stieg der LD 99%-Wert auf 12 μm (autoklavierte Nanosuspension) bzw. auf 22 μm (nicht autoklavierten Probe). Beide Chargen wurden im Kühlschrank gelagert. Mit Hilfe der PCS können Partikel $> 3 \mu\text{m}$ nicht erfasst werden. Deshalb sank sogar der PI. Weil die LD-Volumenverteilung während der Lagerung im Bereich $< 3 \mu\text{m}$ deutlich enger geworden ist, bzw. wesentlich weniger Partikel in diesem Bereich vorlagen und die LD-Verteilung zu größeren Partikeln verschoben hat, detektiert die PCS fälschlicherweise eine engere Partikelgrößenverteilung. Die LD-Partikelverteilung (Abb. 4-31) belegt diesen Effekt am Beispiel der im Kühlschrank gelagerten Probe. Die meisten Partikel liegen über dem Größenbereich von 3 μm .

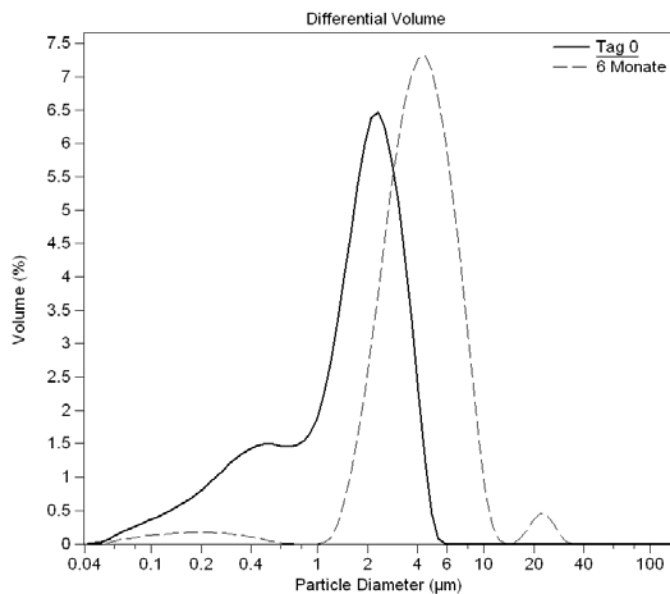


Abb. 4-31:
LD-Volumenverteilungskurven der bei 4-8 °C gelagerten Amphotericin B-Suspension am Tag der Herstellung und nach 6 Monaten

Das Zetapotential, gemessen beim jeweiligen pH-Wert der Nanosuspension, blieb in den ersten Monaten konstant. Bei einem Wert von 30 mV (Betrag) oder höher liegt ein zur elektrostatischen Stabilisierung ausreichend hohes Zetapotential vor. Die Werte lagen, außer der sterilisierten Probe, zunächst unter diesem Wert, so dass eine Zunahme der Aggregation zu verzeichnen war. Nach 12 Monaten war ein leichter Anstieg zu erkennen. Die sterile Suspension besaß ein Potential von -34 mV, das nach einem Sinken des Zetapotentials auf ca -22 mV dann über die nächsten Monate konstant blieb, um nach 12 Monaten auf -46 mV anzusteigen. Hierfür könnten Zersetzungsprodukte des Lecithins oder des Arzneistoffs verantwortlich sein.

4.5.2 Chemische Stabilität der Nanosuspensionen

Die chemische Stabilität der Nanosuspensionen wurde über einen Zeitraum von 3-12 Monaten verfolgt (Abb. 4-32). Der Amphotericin B-Gehalt, der an Tag 1 gemessen wurde, wurde gleich 100% gesetzt. Die autoklavierte Probe zeigte über den Zeitraum von einem Jahr eine deutlich bessere chemische Stabilität (91% nach 12 Monaten) als die unsterilen Proben (68% nach 12 Monaten bei 4-8 °C und 67% nach 3 Monaten bei RT). In den ersten 2 Monaten betrug der Gehalt an Amphotericin B der beiden bei 4-8 °C gelagerten Suspensionen ca. 98%. Bei der Probe, die bei Raumtemperatur gelagert wurde, konnte ein deutlicher Abfall des Gehalts innerhalb des ersten Monats beobachtet werden. Nach einem Monat wurde ein Restgehalt von 70% gemessen. Die ersten Zersetzungsprodukte könnten einen Schutzfilm um den Arzneistoff bilden, so dass nach der anfänglichen schnellen Zersetzung der weitere Abbau verzögert wird. Da nur die Oberflächen der Nanokristalle dem Wasser ausgesetzt sind, findet nur dort ein Abbau des Arzneistoffs statt (Troester and Müller, 2004). Zersetzter Arzneistoff verzögert die weitere Zersetzung im Suspensionskern. Die oxidative Zersetzung der autoklavierten Probe verlief wesentlich langsamer als bei den anderen beiden Proben. Die Ergebnisse sind aber mit einer Unsicherheit durch die geringe Chargenanzahl (n = 1) behaftet. Eine weitere unsterilisierte Charge (4-8 °C) wies hingegen nach 15 Monaten noch 89% des Wirkstoffs auf.

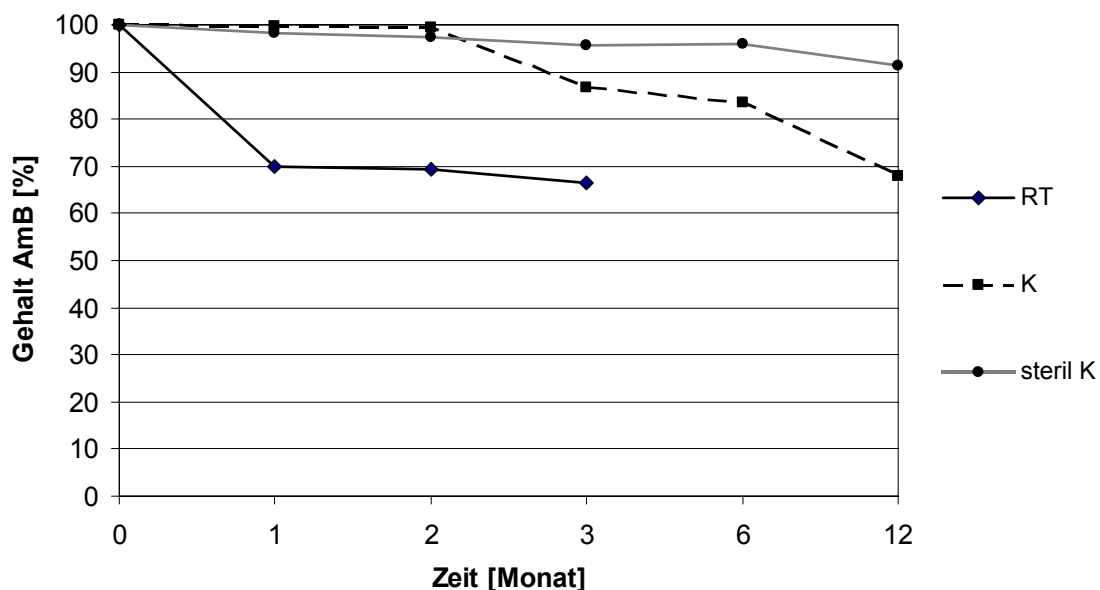


Abb. 4-32: Wirkstoffgehalt der unsterilen Nanosuspensionen, gelagert bei Raumtemperatur und bei 4-8 °C (RT und K), und der autoklavierten Probe, gelagert bei 4-8 °C (steril K); Anfangsgehalt von Amphotericin B wurde gleich 100% gesetzt.

4.5.3 Physikalische Stabilität verschiedener Emulsionsrezepturen

Die Emulsionen wurden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gelagert. Nach 12 Monaten wurden die Basisemulsionen und die Amphotericin B-haltigen Chargen untersucht. Zur Beurteilung der physikalischen Stabilität wurden die Teilchengrößenverteilungen mittels LD und die Partikelgrößen der Hauptpopulationen mittels PCS bestimmt. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Emulsionen sollte größere Partikel detektieren, die durch eine LD-Messung nicht mehr erfasst werden, bei einer parenteralen Applikation allerdings gefährliche Embolien hervorrufen können. Die Rezepturen sind in den Kapiteln des Rezepturscreenings (Kap. 4.1.3 und Tab. 4-8) zu finden. Die Tabelle 4-14 zeigt die Lagerungsdaten der parenteralen Basisemulsionen und die Tabelle 4-15 die Daten der Amphotericin B-Formulierungen. Die mit Amphotericin B beladenen Emulsionen fielen z.T. durch gelb-schmierige Ablagerungen am Glasrand auf.

Tab. 4-14: Charakterisierung der Ausgangsemulsionen (Lipo) an Tag 1 und 1 Jahr nach Lagerung bei Raumtemperatur, Bezeichnungen der Emulsionen siehe Kapitel 4.1.3 und Tab. 4-8, n = 2

Formu- lierung	Zusammensetzung	Alter	d50% [µm]	d99% [µm]	PCS Ø [nm]	PI	ZP	pH
Lipo 0,6%	0,6% Eilecithin 10%MCT	Tag 1	0,289	0,645	254	0,121	-32,6	8,6
		1 Jahr	0,311	0,583	256	0,094	-57,8	4,2
Lipo 0,8%	0,8% Eilecithin 10%MCT	Tag 1	0,298	0,520	255	0,124	-38,6	7,3
		1 Jahr	0,293	0,497	262	0,108	-47,4	5,8
Lipo 1,2%	1,2% Eilecithin 10%MCT	Tag 1	0,238	0,451	249	0,060	-36,3	7,0
		1 Jahr	0,255	0,469	244	0,059	-46,7	5,0
Lipo 2,4%	2,4% Eilecithin 10%MCT	Tag 1	0,253	0,506	250	0,076	-35,7	7,2
		1 Jahr	0,267	0,516	241	0,123	-48,8	3,8
Lipo 1,2% Tw	1,2% Tween 80 10%MCT	Tag 1	0,133	0,334	198	0,128	-17,3	8,6
		1 Jahr	0,128	0,325	197	0,122	-32,6	6,5
AL	MCT 10% 1,2% Lecithin (1% DMPC/99% Ei)	Tag 1	0,307	0,615	250	0,141	-38,4	7,2
		1 Jahr	0,331	0,615	267	0,140	-58,4	3,6
BL	MCT 10% 1,2% Lecithin (10% DMPC/90% Ei)	Tag 1	0,229	0,580	257	0,085	-36,9	7,2
		1 Jahr	0,318	0,586	264	0,114	-57,1	3,6
CL	MCT 10% 1,2% Lecithin (1% SPC-3/99% Ei)	Tag 1	0,339	0,658	265	0,151	-38,4	7,2
		1 Jahr	0,372	0,656	280	0,114	-51,8	3,8
DL	MCT 10% 1,2% Lecithin (10% SPC-3/90% Ei)	Tag 1	0,312	0,638	256	0,098	-37,4	7,2
		1 Jahr	0,337	0,627	273	0,096	-52,3	4,3

Tab. 4-15: Charakterisierung der mit 1 mg/mL Amphotericin B beladenen unsterilen Emulsionen an Tag 1 und 1 Jahr nach Lagerung bei Raumtemperatur (Bezeichnungen der Emulsionen s. Kapitel 4.1.3 und Tab. 4-8, n = 2)

Formulierung	Zusammensetzung	Alter	d50% [µm]	d99% [µm]	PCS Ø [nm]	PI	ZP	pH	AmB [%]
Em 0,6%	0,6% Eilecithin 10%MCT	Tag 1	0,277 ± 0,006	0,576 ± 0,001	204 ± 4	0,119 ± 0,045	-29,4 ± 3	7,5	43,0 ± 15,5
		1 Jahr	0,259 ± 0,026	1,344 ± 0,980	215 ± 3	0,119 ± 0,094	-48,6 ± 5	4,7	
Em 0,8%	0,8% Eilecithin 10%MCT	Tag 1	0,128 ± 0,001	0,309 ± 0,001	195 ± 1	0,135 ± 0,027	-29,8 ± 2	6,6	92,1 ± 7,2
		1 Jahr	0,181 ± 0,011	0,529 ± 0,008	209 ± 0	0,127 ± 0,005	-48,8 ± 2	4,6	
Em 1,2%	1,2% Eilecithin 10%MCT	Tag 1	0,117 ± 0,001	0,284 ± 0,001	180 ± 1	0,126 ± 0,018	-32,3 ± 1	6,5	75,3 ± 2,3
		1 Jahr	0,117 ± 0	0,293 ± 0,002	185 ± 2	0,130 ± 0,017	-43,7 ± 1	5,5	
Em 2,4%	2,4% Eilecithin 10%MCT	Tag 1	0,102 ± 0,001	0,273 ± 0,001	161 ± 1	0,131 ± 0,015	-24,1 ± 1	6,7	75,5 ± 14,9
		1 Jahr	0,106 ± 0	0,278 ± 0,020	170 ± 3	0,142 ± 0,007	-46,0 ± 5	5,5	
Em 1,2% Tw	1,2% Tween 80 10%MCT	Tag 1	0,186 ± 0,013	0,557 ± 0,009	200 ± 1	0,130 ± 0,016	-17,0 ± 1	7,8	83,0 ± 8,5
		1 Jahr	0,224 ± 0,02	0,558 ± 0,004	208 ± 2	0,170 ± 0,005	-34,5 ± 0	5,4	
F	MCT 10% 1,2% Lecithin (1% DMPC/99% Ei, NS mit DMPC)	Tag 1	0,128 ± 0,003	0,308 ± 0,001	186 ± 2	0,137 ± 0,021	-34,4 ± 1	7,0	50,0
		1 Jahr	0,129	0,482	194	0,122	-55,5	4,3	
G	MCT 10% 1,2% Lecithin (10% DMPC/90% Ei, NS mit DMPC)	Tag 1	0,122 ± 0,001	0,306 ± 0,001	179 ± 4	0,123 ± 0,036	-32,3 ± 2	6,9	63,4 ± 5,4
		1 Jahr	0,124 ± 0,002	0,301 ± 0,004	189 ± 1	0,101 ± 0,037	-50,8 ± 1	4,9	
H	MCT 10% 1,2% Lecithin (1% SPC-3/99% Ei, NS mit DMPC)	Tag 1	0,115 ± 0,001	0,301 ± 0,001	167 ± 3	0,135 ± 0,010	-32,5 ± 1	6,9	45,0 ± 10,5
		1 Jahr	0,120 ± 0,002	0,296 ± 0,004	184 ± 2	0,133 ± 0,003	-50,3 ± 2	4,4	
I	MCT 10% 1,2% Lecithin (10% SPC-3/90% Ei, NS mit DMPC)	Tag 1	0,123 ± 0,001	0,307 ± 0,001	176 ± 2	0,128 ± 0,017	-30,2 ± 1	6,8	62,2 ± 0,4
		1 Jahr	0,127 ± 0,001	0,304 ± 0,001	194 ± 2	0,114 ± 0,010	-49,8 ± 1	4,6	

Die unbeladenen Emulsionen zeigten in ihren Partikelgrößen nur leichte Veränderungen. Die unbedeutenden Abweichungen können durch das Wachsen einiger weniger Öltröpfchen zu erklären sein. Daher kann der Durchmesser leicht ansteigen oder sogar abfallen, wenn die wenigen großen Partikel nicht mehr durch die Auswertung der Volumenverteilung (LD) erfasst werden oder außerhalb des Messbereiches der PCS liegen. Auffallend war der pH-Abfall von pH 7-8 auf pH 4-6 und der Zetapotentialanstieg um 10-20 mV bei allen Ausgangsemulsionen. Die Grenzwerte für i.v. Injektionslösungen liegen etwa zwischen pH 3,0 und 10,5 (Bauer et al., 2002). Eine ausreichend langsame Injektion ermöglicht dem Puffersystem des Blutes eine schnelle Angleichung an den physiologischen pH-Wert.

Entscheidend war das Verhalten der beladenen Emulsionen (s. Tab. 4-15). Die Rezepturen zeigten ein geringes Partikelwachstum, einen Abfall des pH-Wertes von pH 6-7 bis auf pH 4-5 und einen Anstieg des Zetapotentials um ebenfalls 10-20 mV. Während der Lagerung kommt es sowohl zur Bildung von Lysolecithin als auch zur Bildung freier Fettsäuren mit einhergehendem Abfall des pH-Wertes (Boberg, 1964; Kawilarang et al., 1980; Washington and Davis, 1987). Bei pH 7,5 vollzieht sich der Abbau einer 2 mg/mL Fungizone[®]-Lösung in sterilem Wasser bei 81 °C langsamer als bei pH 1,5 oder 12,5 (Walker et al., 1998). Innerhalb von 30 min zersetzte sich Amphotericin B zu über 90% in den Lösungen mit einem pH-Wert von 1,5 oder 12, nach 5 Stunden waren bei einem neutralen pH-Wert noch über 91% erhalten. Ein stabiler pH-Wert der Emulsionen im neutralen Bereich wäre somit wünschenswert. Dies könnte durch Zusatz eines Puffers erreicht werden.

Die Zunahme des Zetapotentials wird ebenfalls mit der Zersetzung des Lecithins erklärt (Washington and Davis, 1987). Der Anstieg des Zetapotentials bewegte sich im selben Bereich wie die Veränderung des Zetapotentials der Basisemulsionen. Daher kann die Zunahme der elektrischen Ladung nicht durch Veränderungen des Arzneistoffs und der Einlagerung begründet sein. Dies spricht für einen weiteren Hinweis, die Ursachen im Bereich der Fett- und Lecithinzersetzung zu suchen. Das Partikelwachstum war am auffälligsten bei der Emulsion mit 0,6% Eilecithin, bei der der LD 99%-Durchmesser von 576 nm auf 1,34 µm anstieg. Die Größenzunahme war bei einer der beiden Chargen ausgeprägter als bei der anderen, ausgedrückt durch die große Standardabweichung. Alle anderen beladenen Emulsionen zeigten zwar ebenfalls Partikelwachstum, allerdings lag dieses im selben Größenbereich wie das der Ausgangsemulsionen. Nach einem Jahr bewegt sich der mittlere PCS-Durchmesser zwischen 170 und 210 nm und als Anzeichen für Mikropartikel der d99% zwischen 280 und 530 nm. Alle Emulsionen hätten noch problemlos i.v. appliziert werden können. Im Vergleich zu den unbeladenen Emulsionen, von denen zumindest

Lipofundin® MCT 10% mit 0,8% und 1,2% Eilecithin im Handel sind und eine Zulassung für die gegebene Laufzeit hatten, bewegten sie sich anhand der dargelegten Daten in einem vertretbaren physikalischen Zustand.

Überraschenderweise konnten in allen Proben bis zu mehreren mikrometergroße Amphotericin B-Kristallaggregate unter dem Mikroskop nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4-33a und b). Augenscheinlich wurde Amphotericin B während der Lagerung aus der Lecithinschicht verdrängt. Das folgende Partikelwachstum führte zu Kristallen, die mit anderen Amphotericin B-Partikeln aggregierten und im Glasvial sedimentierten. Nach einem Jahr konnten Arzneistoffkristalle in einem Größenbereich bis zu 20-30 µm gefunden werden. Weiter konnte festgestellt werden, dass das Partikelwachstum fast ausschließlich auf das Auskristallisieren von Amphotericin B zurückzuführen war und nicht auf Instabilitäten der Emulsionsgrundlage. Die geringe Anzahl der größeren Öltropfen kann vertreten werden.

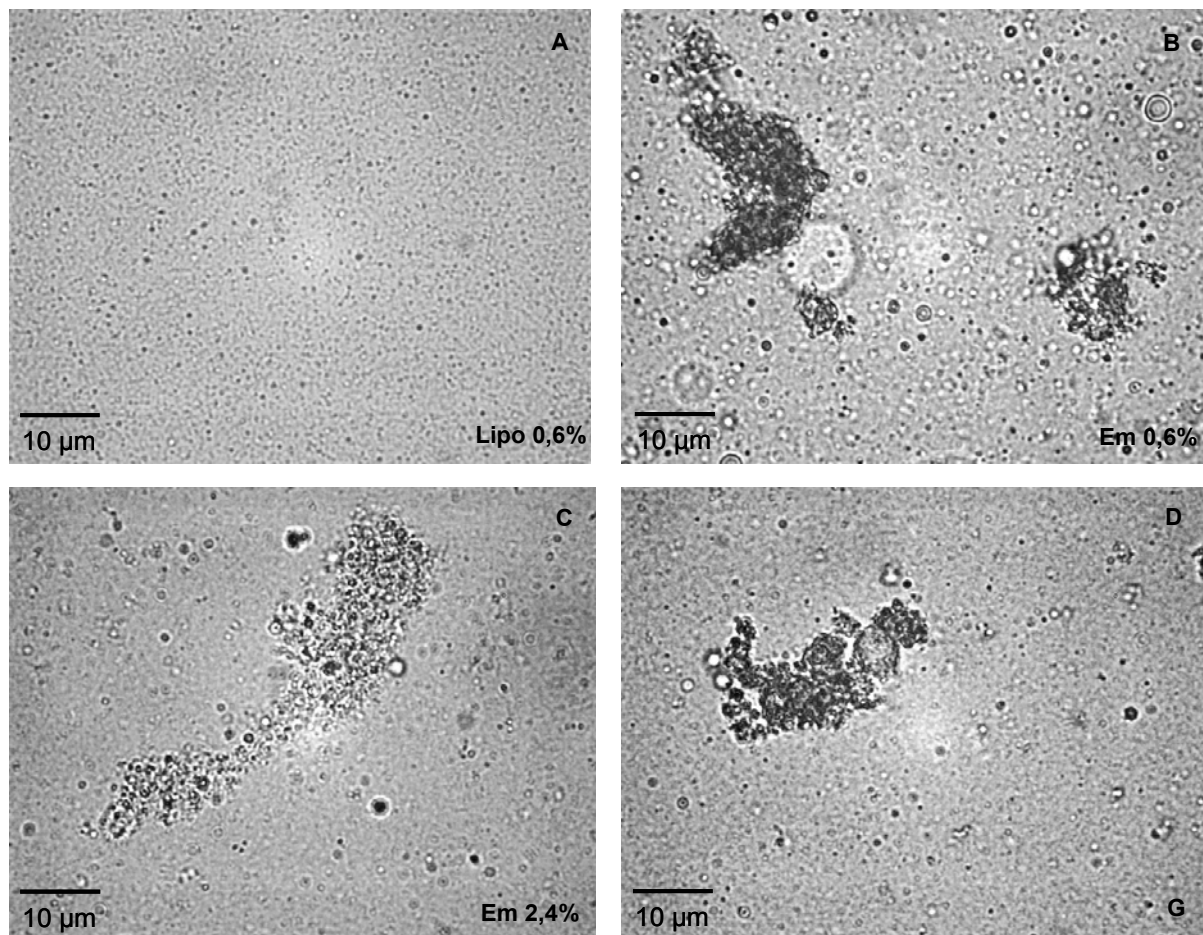


Abb. 4-33a: A: unbeladene MCT 10%-Emulsion (0,6% Eilecithin), Amphotericin B-Emulsionen B: 0,6% Eilecithin, C: 2,4% Eilecithin, D: mit hydriertem Lecithin (10% DMPC, 90% Eilecithin, Suspension mit hydriertem Lecithin)

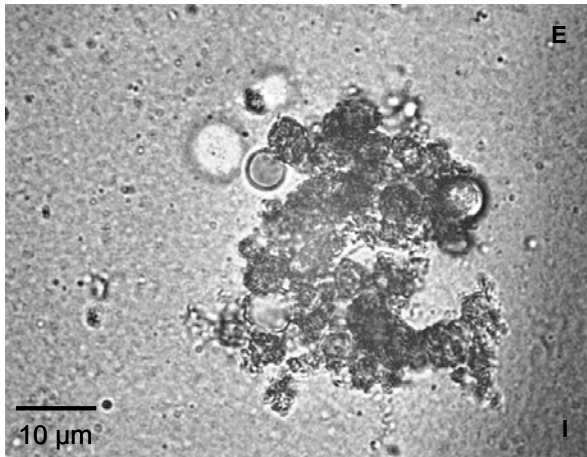


Abb. 4-33b:

Amphotericin B-Emulsion I: mit hydriertem Lecithin (10% SPC-3, 90% Ei-lecithin, Suspension mit hydriertem Lecithin); detaillierte Angaben s. Kap. 4.1.3 und Tab. 4-8

Abb. 4-33: beispielhafte Lichtmikroskopaufnahmen der Emulsionen nach einem Jahr Lagerung bei Raumtemperatur

Um einen genaueren Anhaltspunkt für das Ausmaß der Arzneistoffaggregate zu erhalten, wurden einige Emulsionen mit dem Mastersizer E, ebenfalls einem LD-Gerät, vermessen, da die gewachsenen Amphotericin B-Aggregate, die deutlich unter dem Mikroskop zu erkennen waren, durch das LS 230 nicht genügend ausgeprägt detektiert wurden. Beispielhaft zeigt die Tabelle 4-16 einen Vergleich der beladenen und unbeladenen Emulsionen, die mit dem LS 230, dem Mastersizer E und dem Mikroskop vermessen wurden.

Tab. 4-16: Vergleichende Messung mit dem LS 230, dem Mastersizer und Lichtmikroskop

Emulsion	LD	d50% [µm]	d99% [µm]	Mikroskop
Lipo 0,6%	LS 230	0,31	0,58	wenige Öltropfen bis 3 µm
	Mastersizer E	0,53	0,78	
Em 0,6%	LS 230	0,26	1,34	Öltropfen und AmB Aggregate bis 25µm
	Mastersizer E	0,67	88	

Der Mastersizer E zeigte bei allen Emulsionen eine deutlich größere Partikelgrößenverteilungen als das LS 230, die für die unbeladenen Emulsionen aber noch akzeptabel sind. Besonders die d90-d100%-Angaben der beladenen Emulsionen waren allerdings eher als unrealistisch einzustufen. Womöglich wurden hier eingerührte Luftblasen mitgemessen, wobei die Änderung der Rührgeschwindigkeit keine Besserung brachte. Im Gegensatz zu den Amphotericin B-Emulsionen traten bei der Vermessung der Ausgangsemulsionen keine Partikelgrößen im oberen Mikrometerbereich auf. Mit einem d99% und d100%-Wert von

0,78 und 1,26 μm lagen die Messwerte über denen des LS 230 (d99%: 0,58, d100%: 0,79 μm). Eine mikroskopische Analyse zeigte bei Lipo 0,6% Öltröpfchen bis zu ca. 3 μm und bei der beladenen Emulsion Ölpartikel und Amphotericin B-Aggregate bis zu 25 μm . Die großen Partikel waren nicht gleichmäßig in den Emulsionen vertreten, so dass mehrere Mikroskopausschnitte auf ihre Anwesenheit überprüft werden mussten. Die Beobachtungen zeigten erneut, dass neben den LD- und PCS-Messungen eine visuelle Prüfung mittels Mikroskopie unerlässlich bleibt. Mit Hilfe des Mikroskops war festzustellen, dass der Mastersizer E deutlich zu große Partikel über einer Volumenverteilung von 50% detektierte. Das LS 230 zeigte eine Tendenz zu kleineren Partikeln. Die Hauptpopulation wurde aber eher mit diesem Gerät erfasst. Eine geringere Anzahl großer Partikel, die aber deutlich zu finden und zur Beurteilung der Präparate essentiell sind, waren nur mit dem Mikroskop ohne Verfälschung auffindbar.

4.5.4 Chemische Stabilität der Rezepturen

Die Tabelle 4-16 zeigt ebenfalls den Gehalt von Amphotericin B nach einem Jahr Lagerung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Nach einem Jahr konnten noch zwischen 45 und 92% Arzneistoff gefunden werden. Ein Eilecithingehalt zwischen 0,8 und 2,4 % wirkte sich positiv auf die chemische Stabilität des Arzneistoffs aus. Die Emulsionen mit 0,8% Lecithin zeigten eine sehr gute chemische Stabilität (92,1%). Einzelne Rezepturen aus der Zyklenstudie (Lipofundin[®] MCT 10%, 0,8% Eilecithin vgl. Kap. 4.1.4.1) zeigten ebenfalls nach einem Jahr einen Amphotericin B-Gehalt von 92-98%. Eine Stabilisierung mit Tween[®] 80 wirkt sich ebenfalls positiv aus. In diesen Emulsionen konnten noch 83% des Anfangsgehalts detektiert werden. Ein geringer Lecithingehalt und Mischungen mit hydrierten Lecithinen zeigten keine ausreichende Abschirmung vor der Zersetzung. Hier konnten nur noch Konzentrationen zwischen 43 und 63% nach Lagerung gefunden werden. Mögliche Unsicherheiten in den Ergebnissen bestehen darin, dass die Gehaltsbestimmungen an Tag 1 extern bei einer Firma durchgeführt wurden (Tag 1 = Ankunft im externen Labor, 3 Tage nach Herstellung), nach einem Jahr Lagerung aber in Berlin.

4.5.5 Physikalische Stabilität der Standardrezeptur

Aus bisher genannten Gründen stellte sich die Formulierung mit Lipofundin[®] MCT 10%, 0,8% Eilecithin und eingearbeiteter Nanosuspension mit Eilecithin als geeignete Rezeptur dar.

Die Amphotericin B-Emulsionen ($n = 3$) wurden z.T. autoklaviert, im Kühlschrank (K, 4-8 °C) und bei Raumtemperatur (RT) gelagert und zum Vergleich mit Lipofundin® über 6 Monate beobachtet. Die Untersuchung der mit 1 mg/mL Amphotericin B beladenen Emulsionen unter einem Lichtmikroskop in polarisiertem Licht zeigten keine sichtbaren Kristalle und keine größeren Öltröpfchen. Sie bestätigten die vollständige Einlagerung von Amphotericin B in die Lecithinschicht.

Um die physikalische Langzeitstabilität abzuschätzen, wurde die Leitfähigkeit der Amphotericin B-Emulsion bestimmt und das Zetapotential der Emulsion in auf diese Leitfähigkeit eingestelltes Wasser gemessen. Der pH-Wert entsprach dem der Emulsion (pH 6,4). Die Leitfähigkeit betrug 245 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Das Zetapotential sank von -49,8 mV bei 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ auf -31,7 mV bei dieser ca. 5fachen Leitfähigkeit. Dieses Zetapotential gewährleistet eine ausreichende Lagerstabilität.

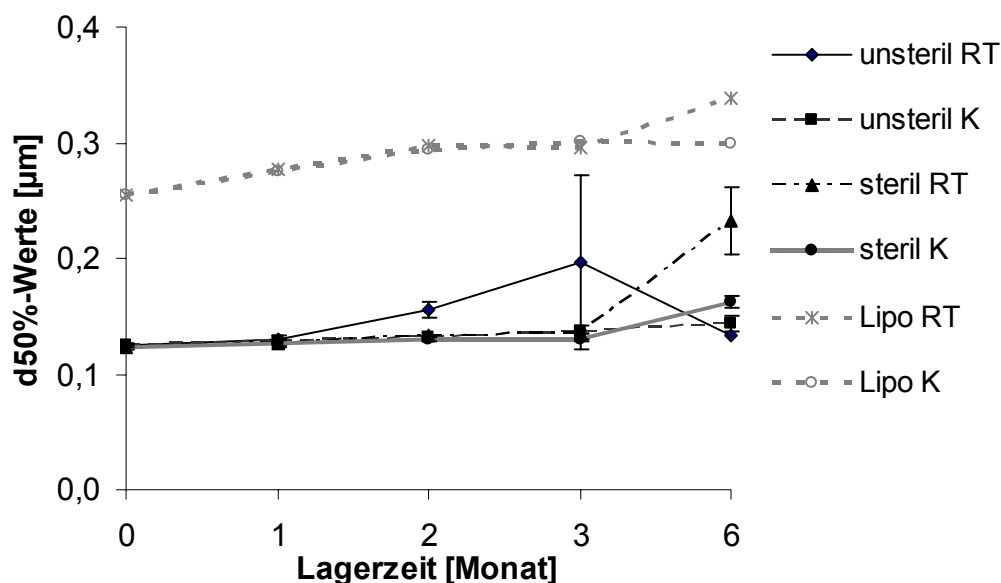


Abb. 4-34: D50%-Werte der mit 1mg/mL Amphotericin B beladenen Emulsionen, autoklaviert (= steril) und nicht autoklaviert (unsteril), gelagert bei Raumtemperatur und im Kühlschrank (4-8 °C); zum Vergleich Lipofundin® MCT 10%, gelagert bei RT und bei 4-8 °C; $n = 3$.

Die d50%-Werte (Abb. 4-34) blieben die ersten 3 Monate konstant. Zwischen Monat 3 und 6 wurde ein leichter Anstieg der d50%-Durchmesser ersichtlich. Auffällig waren nur die nicht autoklavierten RT-Proben. Sie verhielten sich sehr unterschiedlich. Am leichten Anstieg des d50%-Wertes ab Monat 1 mit größer werdender Standardabweichung wurde deutlich, dass

zwei der drei Emulsionen durch physikalische Instabilität (Partikelwachstum) auffielen und sich nach 6 Monaten komplett in ihre Einzelphasen getrennt hatten. Dies kann möglicherweise durch bakterielle Effekte verursacht worden sein. Die 3. Emulsion hingegen trennte sich nicht und ergab die gezeigten Werte für den Monat 6. Die Amphotericin B-Emulsionen zeigten einen parallelen Kurvenverlauf analog Lipofundin® MCT 10%. Der LD-Durchmesser 50% der sterilen RT-Proben war nach 6 Monaten 70 nm größer als der der gekühlten Proben.

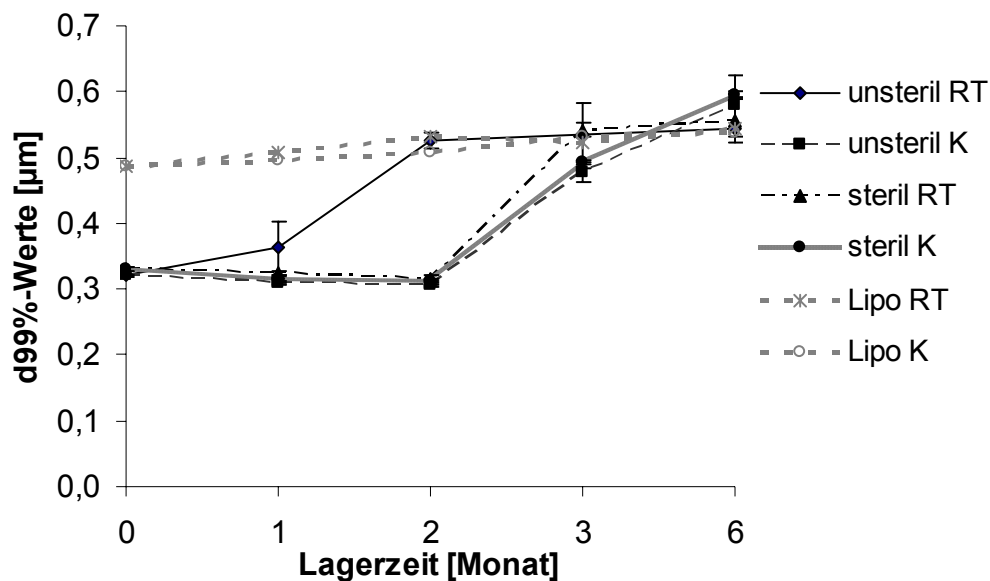


Abb. 4-35: D99%-Werte der mit 1mg/mL Amphotericin B beladenen Emulsionen, autoklaviert und nicht autoklaviert, gelagert bei Raumtemperatur und im Kühlschrank (4-8 °C); zum Vergleich Lipofundin® MCT 10%, gelagert bei RT und bei 4-8 °C; n = 3.

Bei Betrachtung der d99%-Werte (Abb.4-35) wird deutlicher, dass eine physikalische Veränderung der Proben eintrat. Nach einem Partikelgrößenanstieg nach Monat 2 hatten die beladenen Emulsionen nach 6 Monaten ähnliche d99%-Werte wie Lipofundin® MCT 10%, unabhängig davon, ob sie dampfdrucksterilisiert oder bei welcher Temperatur sie gelagert wurden. Grundsätzlich wirkte sich eine Lagerung bei erniedrigter Temperatur bzw. ein Autoklavieren der Proben vorteilhaft auf die Langzeitstabilität aus. Die PCS-Messungen, dargestellt in Abbildung 4-36, zeigten kaum Unterschiede, ausgenommen die Veränderung der RT-Emulsionen, bei denen ja z.T. Phasentrennung erfolgte. Hier wird erneut deutlich, dass eine alleinige Beurteilung der Proben mittels PCS falsche Schlüsse zulassen könnte. Der

LD-Durchmesser 99% stellt gegenüber Veränderungen einen empfindlichen Charakterisierungsparameter dar.

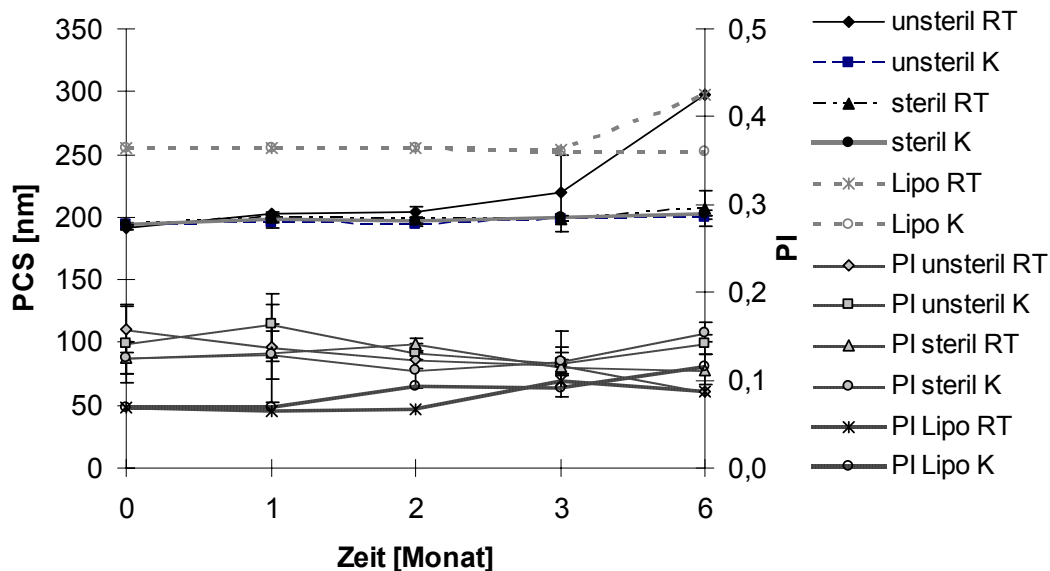


Abb. 4-36: Charakterisierung mittels PCS, n = 3

Die physikalische Instabilität (Partikelwachstum, Phasentrennung) der Amphotericin B-Emulsionen kann mit einer Schlierenbildung an der Glaswand einhergehen. Ein bei allen Proben mit der Zeit ausfallendes Amphotericin B-Sediment blieb bei allen Proben aufschüttelbar. Die Abbildung 4-37 zeigt einige Mikroskopaufnahmen aufgenommen unter polarisiertem Licht. Das mit zunehmender Lagerzeit (Bild A-D) auskristallisierende Amphotericin B aus einer autoklavierten Probe ist gräulich zu erkennen. Die Abbildung 4-38 zeigt hingegen einen Amphotericin B-Agglomerat aus einer durch Instabilität (Phasentrennung) auffallenden Probe, die bei Raumtemperatur gelagert wurde. Im Vergleich dazu befindet sich rechts im Bild eine Lichtmikroskopaufnahme von Lipodunfin® MCT 10% nach 6 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur. Die Rekristallisate der Amphotericin B-Emulsion sind deutlich größer als bei den Proben, die nicht bei den LD- und PCS-Messungen durch Partikelwachstum auffielen, und größer als das ursprünglich eingesetzte Amphotericin B-Pulver. Daher konnte in diesem Fall die Instabilität bezüglich Partikelwachstum bis hin zur Phasentrennung auf eine zu hohe auskristallisierte Amphotericin B-Menge zurückgeführt werden; möglicherweise wurde die Instabilität auch hervorgerufen durch bakterielle Verunreinigung der Proben. Auch andere Autoren mussten eine physikalische Instabilität auf nicht-inkorporiertes Amphotericin B zurückführen (Shadkhan et al., 1997; Trissel, 1995). Die Veränderungen begannen bei den untersuchten Emulsionen nach 2 Monaten.

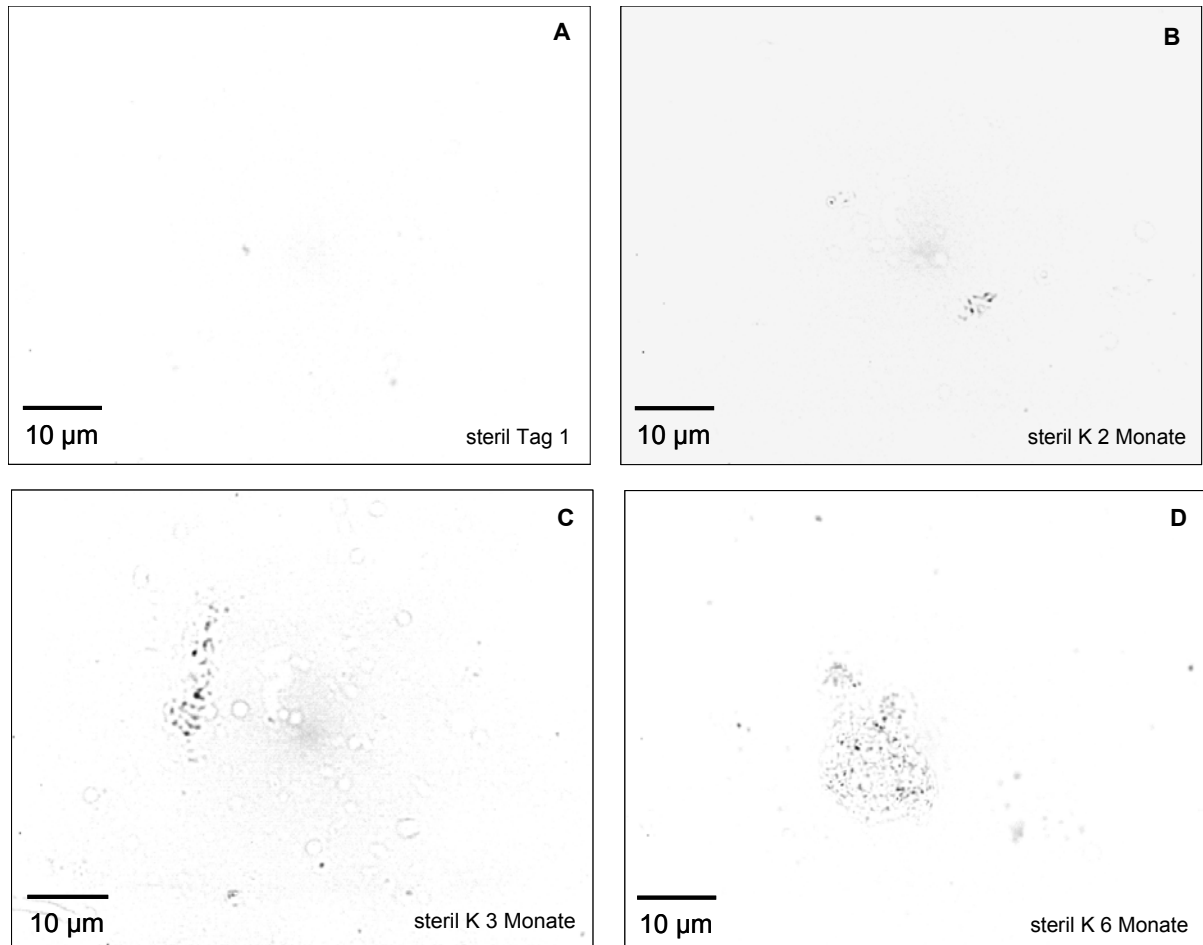


Abb. 4-37 Negativaufnahme der wachsenden Amphotericin B-Kristalle mit zunehmender Zeit, 1000fache Vergrößerung, sterilisierte Probe (Lagerung bei 4-8°C).

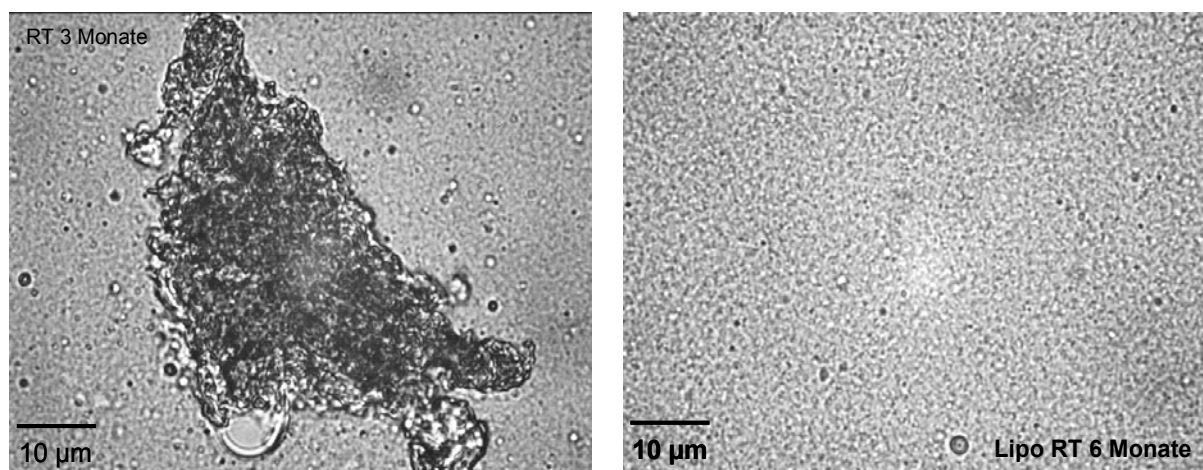


Abb. 4-38: Lichtmikroskopaufnahme einer nicht sterilisierten Amphotericin B-Emulsion nach 3 Monaten (links) und Lipofundin® MCT 10% nach 6 Monaten (rechts), Lagerung bei Raumtemperatur; 1000fache Vergrößerung

4.5.6 Chemische Stabilität der Standardrezeptur

Bei den gelagerten Emulsionen (je Gruppe 3 Emulsionen) bestätigte sich die Beobachtung, dass autoklavierte Proben nicht nur physikalisch, sondern auch chemisch stabiler waren als nichtautoklavierte Proben (Abb. 4-39). Die Abwesenheit von Mikroorganismen könnte den Abbau bzw. die Zersetzung von Amphotericin B verlangsamen. Nach Herstellerangaben müssen sowohl das Pulver als auch die Fertigarzneimittel mit Amphotericin B und die daraus bereiteten Lösungen vorzugsweise unter Lichtausschluss gekühlt gelagert werden. Zubereitungen sollten innerhalb von 24-48 h verbraucht werden. Umso überraschender war nun zu beobachten, dass sich die unsterilen gekühlten Proben durch einen wesentlich schlechteren Arzneistoffgehalt auszeichneten als die Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden. Der erste Monat stellte die kritischste Zeitspanne während der Lagerung dar. Alle Proben zeigten hier einen stärkeren Arzneistoffabbau als in der folgenden Zeit. Bis auf die unsterilen Proben (4-8 °C) blieb nach 4 Wochen der Gehalt konstant oder zeigte eine deutlich langsamere Abnahme. Ab dem 3. Monat erfolgte auch bei den sterilen Proben wieder deutlich eine Wirkstoffabnahme

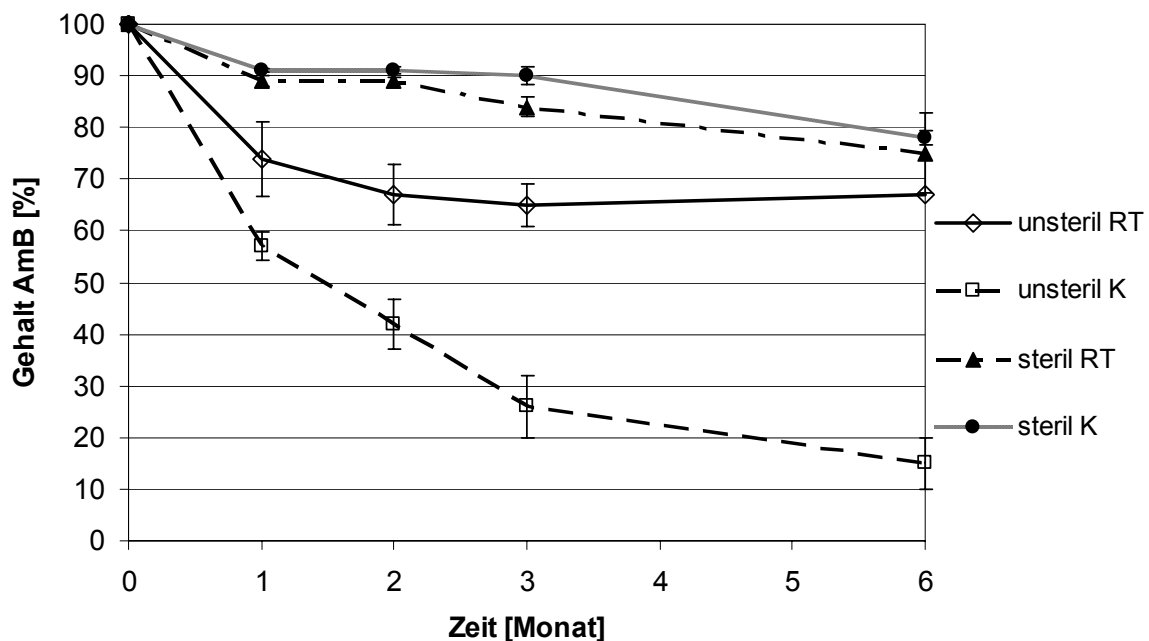


Abb. 4-39: Wirkstoffgehalt der sterilen und unsterilen Amphotericin B-Emulsionen über einen Zeitraum von 6 Monaten; Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur und bei 4-8 °C (RT und K); der Anfangsgehalt an Amphotericin B wurde gleich 100% gesetzt, n = 3.

4.5.7 Zusammenfassende Diskussion

Anhand der mikroskopischen Untersuchungen war zu beobachten, dass sich die Formulierungen während der ersten 2 Monate veränderten. Der Arzneistoff begann aus der stabilisierenden Lecithinschicht auszukristallisieren. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine Umverteilung des gelösten Amphotericin B in der Lecithinschicht sein. Mit fortschreitender Zeit wurde mehr Arzneistoff aus der Schicht verdrängt und führte in einigen Fällen zu einer Separation der einzelnen Phasen. Zunehmend größere Kristalle wurden mittels Lichtmikroskopie detektiert. Die Hauptpopulation der Dispersion zeigte nur eines geringes Partikelwachstum. Die physikalischen Veränderungen durch Alterung, z.B. wie Partikelwachstum (LD-, PCS-Untersuchungen), pH-Erniedrigung und Zetapotentialzunahme, lagen bei fast allen Emulsionen im selben Größenbereich wie die Änderungen bei den Ausgangsemulsionen. Ursache kann wahrscheinlich eine Kombination aus zwei Vorgängen sein:

1. eine „normale“ Alterung während der Lagerung, die auch bei parenteralen Emulsionen ohne Arzneistoff beobachtet wurde, und
2. einer Inkompatibilität durch Auskristallisieren des eingelagerten Arzneistoffs.

Grundsätzlich wirkt sich in den ersten Monaten eine Lagerung bei erniedrigter Temperatur bzw. Autoklavieren der Proben vorteilhaft auf die Partikelgröße aus.

Für die chemische Stabilität kann zunächst festgehalten werden, dass sich die Dampfdrucksterilisation verlangsamernd auf den Arzneistoffabbau auswirkt. Die Dampfdrucksterilisation kann eine erhebliche Reduzierung der physikalischen Stabilität (Partikelwachstum, Auskristallisieren des Arzneistoffs) mit sich bringen. Diese Beobachtungen konnten in dem Fall für die Amphotericin B-haltigen Proben unmittelbar nach der Dampfdrucksterilisation nicht bestätigt werden. Hingegen scheint die Abtötung von Mikroorganismen auf Dauer den Abbau des Arzneistoffs zu verzögern. Einen gewissen zusätzlichen Schutz könnte das durch die Hitzeeinwirkung zerstörte Amphotericin B bewirken. Der Arzneistoff könnte sich mit einer Schutzschicht aus abgebautem Amphotericin umgeben und daher besser vor weiteren Einflüssen geschützt sein. Damit wäre auch die chemische Stabilität einiger Suspensionen zu erklären, bei denen dieser Effekt stärker zum Tragen kommt. Durch das einfachere System aus Emulgator, Arzneistoff und Wasser könnten Umverteilungsvorgänge, die nur an der Partikeloberfläche auftreten, sowie das Erstellen einer Schutzschicht aus bereits zersetztem Amphotericin B schneller vonstatten gehen. Die

autoklavierten Proben sind chemisch stabiler, da durch die kurze Hitzeeinwirkung der Vorgang beschleunigt wird.

Die Untersuchungen der Emulsionen nach einem Jahr Lagerung belegten erneut, dass die Monoschicht aus Eilecithin zwischen Öl und Wasser auch eine gute chemische Stabilisierung gewährleisten kann. Im Gegensatz zu den Emulsionen mit hydrierten Lecithinen (Gehalt nach einem Jahr zwischen 43 und 63%) zeigte sich ein Amphotericin B-Gehalt von 75-98%, wobei der Lecithingehalt von 0,8% den meisten Schutz bot. Auskristallisierter Arzneistoff wurde auch hier stabilisiert. Es ist nicht geklärt, warum eine Erhöhung der Lecithinmenge nicht zu einer Erhöhung der chemischen Stabilität führte. Es wurde zusätzlich bestätigt, dass eine Konzentration von 0,6% keine ausreichende Stabilisierung ermöglichte (43% Amphotericin B). Die Ergebnisse zeigten, dass eine gute chemische Langzeitstabilität erreicht werden kann, auch wenn die Untersuchung der chemischen Lagerstabilität der sterilen und unsterilen Standardrezeptur (1 mg/mL Amphotericin B in Lipofundin[®] MCT 10%) bei unterschiedlichen Temperaturen den geringen Arzneistoffabbau von 10% nicht ganz bestätigen konnten. Abgesehen von den unsterilen Proben (4-8 °C, nur noch 15% Amphotericin B) erfolgte in 6 Monaten ein Arzneistoffabbau zwischen 22 und 33%. Die autoklavierten Proben zeigten hier die besten Resultate.

Um eine Zersetzung von Amphotericin B vorzubeugen, wird eine Lagerung im Kühlschrank vorgeschrieben. Außer für die unsterilen Emulsionen gilt diese Empfehlung auch für die Suspensionen und Emulsionen.

4.6 Löslichkeitsuntersuchungen von Amphotericin B

4.6.1 Löslichkeit in Wasser und Ölen

Löslichkeitsangaben von Amphotericin B für parenteral verwendbare Lösungsmittel sind in der Literatur kaum beschrieben. Allgemein wird Amphotericin B als schwer löslich eingestuft. Amphotericin B ist unlöslich bei pH 6-7. Im stark Sauren oder Basischen (pH 2 oder 11) steigt die Löslichkeit auf 100 mg/L (Beck et al., 1982). Diese pH-Bereiche sind für parenteral zu verabreichenden Produkte ungeeignet. Zudem handelt es sich bei Amphotericin B um einen makrozyklischen Laktoring, der durch Einfluss von Säuren und Laugen gespalten werden kann. Dadurch verliert das Molekül möglicherweise seine Wirksamkeit. Organische Lösungsmittel erhöhen die Löslichkeit auf z.B. 2,0 mg/mL in Dimethylformamid und Methanol oder 0,5 mg/mL in Ethanol. Die Wasserlöslichkeit kann durch

Natriumlaurylsulfat oder Natriumdesoxycholat verbessert werden. Schmidt zeigte anhand von orientierenden Lösungsversuchen in pflanzlichen und synthetischen Ölen sowie Mischungen von Ölen und Tensiden, dass ein geeignetes Lösungsmittel für parenterale Zwecke kaum zu finden ist.

Amphotericin-Pulver wurde in Glasvials mit LCT, MCT oder bidest. Wasser vermengt und die Proben in einem Inkubationsschrank (Innova 4230, New Brunswick Scientific, D-Nürtingen) bei Raumtemperatur oder 5 °C mit 80 U/min ca. 48 h geschüttelt. Anschließend wurden 2 mL der Proben in 2 mL Eppendorffgefäße überführt und 60 min mit 17000 U/min zentrifugiert (Biofuge 22R, Heraeus, Osterode). Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut 60 min zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-17 zusammengefasst.

Tab. 4-17: Die Löslichkeit von Amphotericin B-Pulver nach ca. 48 h in verschiedenen Lösungsmitteln

System	Temperatur	LCT [mg/L]	MCT [mg/L]	Wasser [mg/L]
AmB + Lösungsmittel	24 °C	0,32	< 0,1 (n = 2)	< 0,1 (n = 2)
AmB + Lösungsmittel	5 °C (n = 6)	0,13 ± 0,09	0,07 ± 0,08	0,03 ± 0,03
AmB + Lösungsmittel, zur vollständigen Benetzung 2 Zyklen 500 bar homogenisiert	24 °C	0,41	0,15	-
AmB + Lösungsmittel, zur vollständigen Benetzung 2 Zyklen 500 bar homogenisiert	5 °C	0,55	0,19	-

Die Löslichkeit in MCT und Wasser bei Raumtemperatur konnte nicht eindeutig bestimmt werden, da mit der angewandten HPLC-Methode kein Peak ermittelt werden konnte. Infolge des zweimaligen Homogenisierens des Öls mit dem Pulver (d50%: 8 µm) stieg durch die Vergrößerung der Oberfläche (Partikelverkleinerung) und zusätzlich durch die bessere Benetzung die Lösungsgeschwindigkeit etwas an, sodass nach 48 h ein leicht höherer Wert verzeichnet werden konnte.

4.6.2 Sättigungslöslichkeit der Nanosuspension

Eine sehr starke Zerkleinerung der Partikelgröße unter 1-2 μm (z.B. durch die Hochdruck-homogenisation) führt zu einem Anstieg der Sättigungslöslichkeit (Vorteil der Nanosuspensionen). Dies wird durch die Kelvin-Gleichung beschrieben (hoher Lösungsdruck). Peters (1999) und Grau (2000) konnten zeigen, dass sich die Sättigungslöslichkeit annähernd verdoppelt, wenn bei einer mit Poly(oxy)ethylenverbindung stabilisierte Suspension der Hauptdurchmesser des mikronisierten Produkts in den Nanometerbereich abgesenkt wird. Die Nanosuspensionen (Standardrezeptur: 2,5% Amphotericin B, 2,4% Eilecithin, 95,1% Wasser) wurden analog der Emulsionen zentrifugiert und untersucht. In der Tabelle 4-18 sind die Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt. Es handelte sich um aggregierte Nanosuspensionen.

Tab. 4-18: Wäßriger Überstand der Nanosuspensionen nach ca. 48 h und die LD 50%- und 99%-Werte der aggregierten Nanosuspensionen

Temperatur	mg/L	d50%	d99%
24 °C (n = 2)	45,7 \pm 13,0	1,8-3,9 μm	3,7-10,3 μm
5 °C (n = 7)	52,7 \pm 16,2	1,7-3,9 μm	3,7-10,2 μm

Die Sättigungslöslichkeit von Amphotericin B in Wasser konnte durch die Verarbeitung als Nanosuspension, auch wenn die Nanokristalle aggregiert vorlagen, um mehr als das 1000fache gesteigert werden. Dieser Effekt tritt eigentlich in einem Größenbereich zwischen 1 und 2 μm auf. Auch in einer aggregierten Nanosuspension liegen noch kleine Einzelkristalle im Bereich unter 1-2 μm vor. Die enorme Löslichkeitssteigerung kann daher geringfügig mit der Reduktion der Partikelgrößen weit aus wichtiger aber mit dem Zusatz von Eilecithin begründet werden. Eilecithin stabilisiert nicht nur die Suspension, sondern lagert zusätzlich Amphotericin B in Eiliposomen ein. Es lag eine geringfügig bessere Löslichkeit bei niedriger Temperatur vor. Möglicherweise wurde bei den RT-Proben bereits etwas Amphotericin B abgebaut. Der sehr geringe Unterschied kann auch durch die wesentlich niedrigere Probenanzahl zustande kommen und liegt somit im Schwankungsbereich des Verfahrens.

4.7 Temperaturempfindlichkeit

4.7.1 Substanzverlust durch die Herstellungsmethode

Um zu beurteilen, ob es durch die Temperaturbelastung während der Produktion der Nanosuspensionen und Emulsionen zu einer Zersetzung des Arzneistoffs kommt, wurde der Arzneistoffgehalt von Suspensionen und Emulsionen vor und nach der Homogenisation mittels HPLC bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Wiederfindungsrate für die Suspensionen zwischen 95 und 105% und für die Emulsionen zwischen 98 und 101% liegt. Ein geringer Verlust der Nanosuspensionen bzw. ein Zugewinn dürfte eher der Adhäsion der Feststoffpartikel an Gerätschaften und inhomogener Probennahme zuzuschreiben sein.

4.7.2 Autoklavierstabilität von Pulver, Nanosuspension und Emulsion

Amphotericin B ist ein hitzeempfindliches Molekül (Alpharma, 2002; Pyle, 1981; Sievers et al., 1996; Walker et al., 1998). Bisher konnte beobachtet werden, dass während der Hitzeeinwirkung, z.B. durch den Prozess des Autoklavierens, der Gehalt an Amphotericin B abnahm. Um die chemische Hitzeempfindlichkeit besser beurteilen zu können, wurden Pulver, Nanosuspensionen (Standardrezeptur: 2,5% Amphotericin B, 2,4% Eilecithin, 95,1% Wasser) und Emulsionen (Standardrezeptur: 1mg/mL Amphotericin B in Lipofundin® MCT 10%) unterschiedlichen Sterilisationsbedingungen ausgesetzt. Um Bedingungen beizubehalten, in denen Sterilität erreicht werden kann, wurden nach folgender Gleichung aus dem Standardverfahren (121 °C, 15 min) die Autoklavierparameter für ein Äquivalenzverfahren (Wallhäußer, 1988) berechnet:

$$F_T^z = \frac{F_{121^\circ C}^z}{10^{\frac{T-121}{z}}}$$

F: Effektivität, Haltezeit bei der Verfahrenstemperatur in min

T: Temperatur in °C

Z: keimspezifischer Wert, = 6 für Sporen von Bac. stearothermophilus

„Die“ kursiv gedruckten Parameter in Tabelle 4-19 erzielen theoretisch keine Sterilität, sollten jedoch Hinweise über einen verminderten Amphotericin B-Abbau durch eine geringere Temperatureinwirkung zeigen.

Tab. 4-19: Gehalt von Amphotericin B-Pulver, Nanosuspension und Emulsionen nach unterschiedlichen Autoklavierbedingungen; mit „-“ gekennzeichnete Versuche wurden nicht durchgeführt.

Parameter	AmB Pulver [%]	Nanosuspension [%]	Emulsion [%]
125 °C, 4 min (Autoklav)	91,3	90,0	-
121 °C, 15 min (Autoklav)	92,1 ± 6,2 (n=4)	93,2 ± 2,0 (n=5)	82,4 ± 2,7 (n=13)
<i>Trockenschrank 100 °C, 40 min</i>	88,8	99,0	-
Trockenschrank 160 °C, 120 min	nicht mehr löslich im Lösungsmittel für HPLC-Untersuchung (dunkel orange Färbung des Pulvers)	-	-
<i>110 °C, 15 min (Autoklav)</i>	-	-	90,3 ± 3,8 (n=2)

Das Pulver und die Suspensionen waren unter Standardbedingungen chemisch stabiler als die Emulsionen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass das Amphotericin B-Pulver ohne Flüssigkeitszusatz behandelt wurde. Eine längere Hitzeeinwirkung wirkte sich ungünstig auf den Arzneistoffgehalt aus. 40 min bei lediglich 100 °C führte zu einem Abbau von 11% Amphotericin B; längere Behandlung bei 160 °C veränderte die Arzneistoffsubstanz. Diese verfärbte sich dunkel-orange und war in den gebräuchlichen Lösungsmitteln nicht mehr zu lösen. In den Nanosuspensionen wurde, wie bisher beobachtet, Amphotericin B deutlich besser vor der Zersetzung geschützt als in den Emulsionen. Bei den Emulsionen wirkte sich eine niedrigere Temperatur bei gleich bleibender Zeitdauer positiv auf das Ergebnis aus (110°C versus 121°C, 15 min). Die Ergebnisse bestätigen die Theorie eines Schutzmantels, der über den schützenden Lecithineffekt hinaus die Nanosuspension vor einer schnellen Zersetzung schützt. Im Pulver ohne Flüssigkeit kommt nur der Schutzmanteleffekt zum Tragen.

4.7.3 Temperaturabhängige chemische Stabilität Amphotericin B-beladener Emulsionen

Lee et al. (1994) konnten zeigen, dass Amphotericin B in 5%iger Dextroselösung 5 Tage lang stabil bleibt. Walker et al. (1998) beobachteten den Abbau einer 2 mg/mL Fungizone[®]-Lösung in sterilem Wasser nach Einstellung des pH-Wertes auf 1,5, 7,5 und 12,5. Bei pH 7,5 vollzog sich der Abbau bei 81 °C recht langsam. Nach 5 Stunden waren noch 91% der Anfangskonzentration erhalten. Bei pH 1,5 und 12,5 wurden hingegen 90% Amphotericin B während der ersten 30 Minuten abgebaut. Weiterführend sind bisher kaum Daten über Stabilitäten in Fettemulsionen wie Intralipid[®] veröffentlicht. Um ein genaueres Verständnis der Anfälligkeit gegen Hitze der beladenen Emulsionen zu erlangen, wurden die beladenen Systeme (1 mg/mL Amphotericin B in Lipofundin[®] MCT 10%) über 7 Stunden unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt. Jeweils 3 Chargen wurden entweder in Wasserbädern oder in einem Trockenschrank (120 °C) aufbewahrt. Nach entsprechender Zeit wurden Proben gezogen, diese im Eisbad heruntergekühlt und unmittelbar danach für die HPLC aufbereitet und schnellstmöglich vermessen.

Die Versuche konnten zwar die Bedingungen im Autoklaven, insbesondere das Aufheizen, nicht genau simulieren, sie gaben aber orientierende Hinweise. Anhand der Abbildung 4-40 ist ersichtlich, dass innerhalb der ersten 15 min kein Unterschied zwischen den einzelnen Temperaturen zu beobachten war. Der Amphotericin B-Gehalt liegt zwischen 91 und 93%. Nach 15 min erfolgt bei 120 °C ein rascherer Abbau als er bei 60-100° erfolgt ist. Nach einer Einwirkzeit von 3 h konnte lediglich nur noch 58% Arzneistoff bei einer Behandlung im Trockenschrank detektiert werden. Je niedriger die Temperatur gewählt wurde, desto langsamer war der Arzneistoffabbau nach 7 h. Bei 100, 80 und 60 °C wurden noch 68, 77 und 76% Amphotericin B in den Proben gemessen. Es ergab keinen Unterschied, ob die Emulsionen 60 oder 80 °C ausgesetzt waren. Unter moderateren Bedingungen (60-100 °C) über einen Zeitraum von 2-3 h wurde Amphotericin B in der Lecithinschicht gleichermaßen stabilisiert.

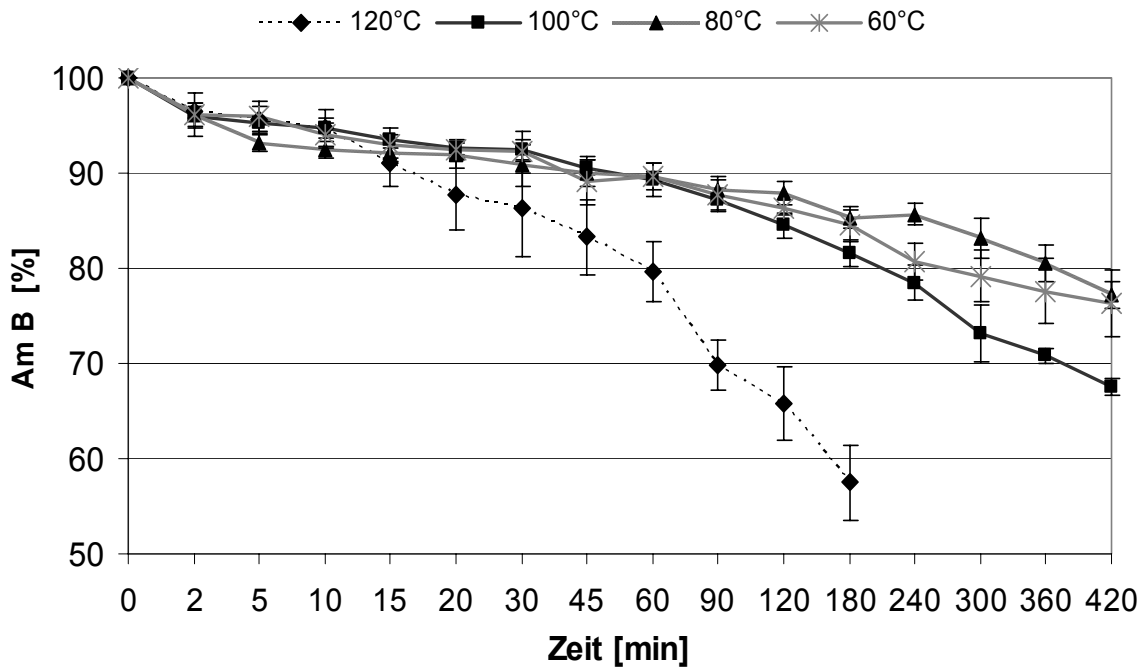


Abb. 4-40: Amphotericin B-Gehalt in den Emulsionen (1 mg/mL Amphotericin B in Lipofundin® MCT 10% mit 0,8% Eilecithin) über 7 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen

4.7.4 Zusammenfassende Diskussion

Zusammenfassend muss weiterhin gelten: Je kürzer und moderater die Hitze auf die beladenen Emulsionen einwirkt, desto langsamer ist der Amphotericin B-Abbau.

4.8 Quantifizierung des ungelösten Amphotericin B-Anteils in den Emulsionen mittels Zentrifugation

4.8.1 Fungizone® in Lipofundin® MCT 10%

Es wurde häufig versucht, Fungizone® in parenterale Emulsionen einzuarbeiten (Chavanet et al., 1997; Heinemann et al., 1997). Z.T. führte dies zu starken Inkompatibilitäten (Heide, 1997; Ranchere et al., 1996; Trissel, 1995). Shadkhan et al. (1997) konnten zeigen, dass diese physikalischen Instabilitäten in hohem Maße von der Herstellungstechnik abhängig sind.

Die Stammlösung des im Deutschland im Handel erhältlichen Fungizone[®], Amphotericin B-Trockensubstanz von der Firma Bristol-Myers-Squibb (D-München), wurde - wie in der Gebrauchsinformation beschrieben - hergestellt: Einer Flasche mit 50 mg Amphotericin B wurden 10 mL Wasser für Injektionszwecke zugesetzt (5 mg/mL). Die Flasche wurde so lange geschüttelt, bis die Lösung klar war. In vorbereitete 50 mL Vials mit Lipofundin[®] MCT 10% (0,8% Eilecithin) wurde die Stammlösung gegeben, um eine Endkonzentration von 0,2 mg/mL analog Shadkhan et al. (1997) zu erhalten. Im Gegensatz zur Gebrauchsinformation bereite Shadkhan die Stammlösung mit 5% Dextroselösung zu. Die hier im Versuch hergestellten Ansätze wurden 1 min geschüttelt. Nach den angegebenen Zeiten (vgl. Abb. 4-41) wurden je 2 mL Emulsion entnommen, 3 mal 45 min bei 22938 x g zentrifugiert, die Ölphase zwischendurch abgenommen und Öl und Präzipitat separat mit Wasser gewaschen. Die gewaschenen Präzipitate aus Öl und Wasserphase wurden vereint und anhand von UV-Messungen bei 405 nm der Arzneistoff-Gehalt bestimmt. Als Referenz wurde eine Eichgerade mit Fungizone[®] (in Methanol) hergestellt.

Die Emulsionen wurden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gelagert. Eine Flasche wurde für die Untersuchungen gewählt, 2 Flaschen blieben zunächst unangetastet als Reserve. Innerhalb der ersten 45 min nahm der PCS-Durchmesser um 10 nm ab, um dann über 3 Wochen konstant bei 267 nm zu bleiben (PI: 0,09). Über 3 Wochen konnte keine Phasentrennung der Emulsionen beobachtet werden. Innerhalb von 72 h wurde allerdings ein feines gelbes, gut aufschüttelbares Sediment auf dem Flaschenboden erfasst. Eine mikroskopische Untersuchung des Präzipitats zeigte ein zusammenhängendes System aus feinen Kristallen. Nach 4 Wochen trennte sich das System komplett in Öl und Wasserphase und zeigte nach Redispergierung der Phasen einen PCS-Durchmesser von 296 nm. Die zwei Reserveflaschen zeigten diese Instabilität nicht, so dass die letzten Proben aus einer Reserveflasche entnommen wurden (PCS: 272 nm). Shadkhan berichtete von einer vollständigen Phasentrennung (Öl/Wasser) nach 24 h. Die Abbildung 4-41 zeigt die Gehaltsbestimmung des durch Zentrifugation gewonnenen Amphotericin B im Vergleich mit den Ergebnissen von Shadkhan. Dieser verwendete ausschließlich Emulsionen mit LCT, das ein geringfügig besseres Lösungsmittel für Amphotericin B als MCT darstellt.

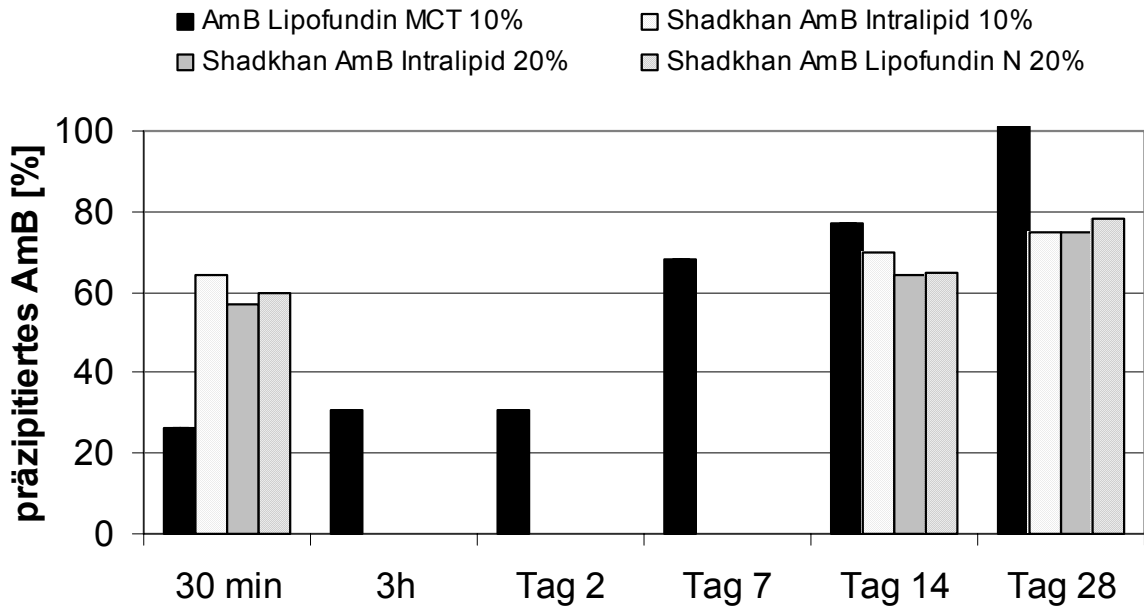


Abb. 4-41: Gehalt des präzipitierten Amphotericin B nach Zentrifugation der Fungizone-Emulsionen nach angegebener Zeit (AmB Lipofundin[®] MCT 10%); zum Vergleich die Ergebnisse von Shadkhan et al. (1997) in Intralipid[®] 10% und 20% sowie Lipofundin[®] 20%.

Innerhalb von 30 min präzipitierten 27% des Amphotericin B; innerhalb von 3 h waren es 31%. Über einen Zeitraum von 4 Wochen kristallisierte der gesamte Arzneistoff aus. Shadkhan hatte bereits 60% auskristallisierten Arzneistoff innerhalb der ersten 30 min gefunden. Es wird häufig berichtet, dass eine Zumischung zu parenteralen Emulsionen innerhalb von zwei Stunden zu physikalischen Instabilitäten führt, die sich in Aufrahmen der Emulsion und Präzipitation des Arzneistoffs äußern (Ericsson et al., 1996; Heide, 1997; Washington et al., 1993). Trissel berichtet von Präzipitaten mit einer Partikelgröße von über 10 µm (Trissel, 1995). Andere Autoren berichten von einer physikalischen Kompatibilität und Stabilität über 24 h bis zu einer Konzentration von 2 mg/mL (Lopez et al., 1996; Owens et al., 1997; Ranchere et al., 1996). Shadkhan et al. (1997) konnten zeigen, dass die physikalischen Instabilitäten in hohem Maße von der Herstellungstechnik abhängig sind. Starkes Schütteln der 10 und 20%igen Fettemulsion-Fungizone[®]-Mischungen führte zur Stabilisierung. Walker et al. (1998) konnten diese Beobachtung bestätigen, allerdings waren die Mischungen stark mit Glukoselösung verdünnt. Die Mischungen, die über 18 Stunden bei 2800 U und Raumtemperatur geschüttelt wurden, zeigten im Gegensatz zu den obigen Beobachtungen,

dass der freie Anteil von Amphotericin B anstatt bei 60% nur noch bei 10% lag. Nach einem Monat Lagerung bei Raumtemperatur oder 4 °C wurden keine Instabilitäten beobachtet. Nach einem Monat war noch 90% Amphotericin B gebunden. Dies führte zu der Vermutung, dass das Ausmaß der physikalischen Instabilität stark vom nicht gebundenen Anteil an Amphotericin B abhängt. Die Beobachtungen während der Langzeistabilität (6-12 Monate) der in dieser Arbeit getesteten Emulsionen bestätigen diese Annahme nicht. Die Emulsionen mit Lipofundin® MCT 10% zeigten im Gegensatz zu Shadkhan et al. über den Zeitraum von 28 Tagen trotz eines hohen Anteils an freiem Amphotericin B (Amphotericin B-Sediment) in 2 von 3 Fällen keine Phasentrennung bei gleich bleibender PCS-Größe.

Beim Herstellen dieser Lösungen wird die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) für den Lösungsvermittler Natriumdesoxycholat unterschritten. Die CMC liegt zwischen 190-240 mg/100 mL aqua ad inj. (Heide, 2003). Zusätzlich wird dem Amphotericin B der Lösungsvermittler entzogen, da sich Lecithin mit dem Natriumdesoxycholat verbindet.

Solche Arzneizubereitungen, die durch einfaches Schütteln hergestellt werden, müssen weiterhin als nicht sicher eingestuft werden. Ein leichtes Aufschütteln des Präzipitats bedeutet nicht, dass sich der Arzneistoff gelöst hat. Den Ansatz, die Technik der Hochdruckhomogenisation als „starkes Schütteln“ zum Herstellen von Amphotericin B-haltigen Emulsionen zu nutzen, kann anhand der Versuche Shadkhans als guter Lösungsweg bestätigt werden, da diese Technik im Vergleich zum einfachen Schütteln durch die hohen Strömungsgeschwindigkeiten und Energiedichten wesentlich effektiver ist.

4.8.2 Untersuchung von Emulsionen, hergestellt mittels Hochdruckhomogenisation

4.8.2.1 Trennung der beladenen Emulsionen mittels Zentrifugation

Das Zentrifugieren der durch Hochdruckhomogenisation beladenen Emulsionen bei 22938 x g führt zum Flotieren der Ölphase. Ungelöstes Amphotericin B wird als gelbes Sediment aufgefunden. Eine Mindestzeit zum vollständigen Sedimentieren der Partikel (Amphotericin B-Kristalle oder -Öltropfen) kann mittels des Stokesschen Gesetzes berechnet werden. Bei einer angenommenen Partikeldichte von 2,5 g/cm³, einer Viskosität von 1 mPas (Wasser) und einer Sedimentationsstrecke von 2 cm (Eppendorff Gefäß) wurde für sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 50 nm eine Sedimentationszeit von 7 min und 7 sec berechnet, für Partikel mit einem Durchmesser von 500 nm eine Zeit von 4,3 sec und für 1 µm-Partikel eine

Zeit von 1 sec. Daher ist eine Zentrifugationszeit von 45 min bei 22938g für diese Untersuchungen mehr als ausreichend. 2 g Emulsion, genau gewogen, wurden in einem Eppendorffgefäß mehrfach für 45 min zentrifugiert, das Öl abgenommen, das Präzipitat 3 mal mit Wasser gewaschen und anschließend in Methanol gelöst. Der Amphotericin B-Gehalt der ursprünglichen Emulsion wurde ebenfalls mitbestimmt.

4.8.2.2 Validierung des Systems

Um die Zuverlässigkeit des Systems zu überprüfen, wurden sowohl genau definierte Mengen Amphotericin B-Pulver als auch Amphotericin B-Nanosuspension (2,5% Amphotericin B, 2,4% Eilecithin, 95,1% Wasser) mit Lipofundin® MCT 10% 1 min kräftig geschüttelt (Vortex) und der Zentrifugation unterzogen. 100,3% Arzneistoff wurden nach der Zugabe des Pulvers als Sediment analysiert. Unter Berücksichtigung der Löslichkeiten aus Kapitel 4.6.1, lösen sich maximal $1,2-3,2 \times 10^{-5}$ mg/mL Amphotericin B-Pulver in der Emulsion. Dies kommt der Wiederfindung von 100% nahe. Ungefähr 0,047 mg/mL Amphotericin B als Nanosuspension lösen sich in Lipofundin® MCT 10%. 96,2% Amphotericin B würden somit ungelöst vorliegen. Im Mittel betrug der wiedergefundene ungelöste Teil 96,0%. Durch einminütiges kurzes Schütteln konnte kein Amphotericin B in der Lecithinschicht gelöst werden.

4.8.3 Beladene Emulsionen

Mit 1 mg/mL Amphotericin B beladene Emulsionen wurden bei Raumtemperatur und bei 5 °C gelagert und über einen Zeitraum von 28 Tagen in Bezug auf den ungelösten Amphotericin B-Anteil untersucht (vgl. Abb.4-42).

Einen Tag nach der Herstellung lagen 56% ungebundenes bzw. ungelöstes Amphotericin B als Sediment nach der Zentrifugation vor. Wurde der Gehalt des Sediments auf die Amphotericin B-Konzentration am Tag des jeweiligen Versuchs bezogen, wurde bei den Proben, gelagert bei Raumtemperatur, zwischen Tag 7 und 28 zwischen 76 und 79% freies Amphotericin B gefunden. Die gekühlten Proben wiesen an Tag 7 64% und an Tag 28 74% freies Amphotericin B auf. Wurde die Berechnung mit Bezug auf den Anfangsgehalt an Amphotericin B vollzogen, waren nach 4 Wochen nur noch 35% (RT) bzw. 45% (5 °C) ungelöstes Amphotericin B zu finden.

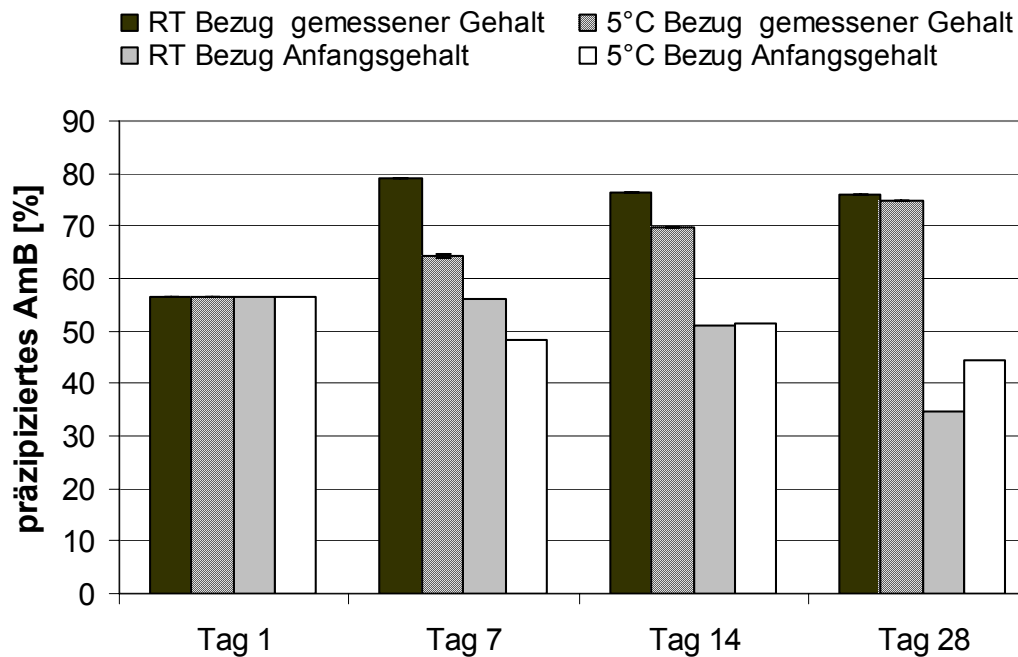


Abb. 4-42: Gehalt des präzipitierten freien Amphotericin B nach Zentrifugation der mit 1 mg/mL beladenen Emulsion an verschiedenen Tagen; die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur und 5 °C; der Gehalt des Sediments wurde auf den jeweiligen Amphotericin B-Gehalt der Emulsion oder auf den Anfangsgehalt an Tag 1 bezogen.

Eine Bestimmung des Amphotericin B-Gehalts am jeweiligen Tag der Untersuchung ist unbedingt notwendig, um Aussagen über den wirksamen Bestandteil machen zu können. Ohne diese Daten können Fehlinterpretationen über die Aufnahme in die Grenzschicht zwischen ölig und wässriger Phase entstehen.

Durch die Hochdruckhomogenisation wurde die vollständig eingearbeitete Menge an Amphotericin B im Gegensatz zum Schütteln deutlich erhöht. Die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit und die Ergebnisse aus Kapitel 4.8.2.2 zeigten, dass 4% Amphotericin B-Suspension durch Schütteln gelöst werden konnte. Durch die Hochdruckhomogenisation bei 600 bar konnte zusätzlich 40% Amphotericin B in der Lecithinschicht eingelagert werden. Geht man davon aus, dass sich mindestens 44% Amphotericin B während der Herstellung lösen, kann dieses Emulsionssystem mit mindesten 0,4 mg/mL Amphotericin B beladen werden. In einem weiteren Versuch wurden 0,2 mg/mL beladene Emulsionen hergestellt und dem Zentrifugationstest unterzogen. Trotz der obigen Ausführung wurden 31% (0,05 mg/mL) Amphotericin B durch die Zentrifugation sedimentiert. Eine Erklärung für dieses Verhalten liegt in der Zentrifugation selbst. Während der Zentrifugation kommen sich die beladenen

Partikel mit Amphotericin B in der Lecithinschicht unnatürlich nahe, und die stabilisierten Öltröpfen mit dem Arzneistoff in der Lecithinschicht treten in Wechselwirkung. Durch die Zentrifugalkräfte fügen sich die Öltröpfen zusammen. Bis zu diesem Zeitpunkt gelöstes Amphotericin B wird aus der Lecithinschicht verdrängt und daher als Sediment ausgefällt.

Der Versuch zeigte, dass sich mittels Zentrifugation bei 22938 x g nicht bestimmen lässt, wie viel Arzneistoff tatsächlich vollständig gelöst vorliegt. Der in die Lecithinschicht eingebrachte Anteil liegt deutlich über dem gefundenen Ergebnis von 44%. Die Kristalle müssen durch ein anderes Verfahren abgetrennt werden.

4.8.4 Zusammenfassende Diskussion

Arzneizubereitungen, die durch einfaches Schütteln hergestellt werden, müssen weiterhin als nicht sicher eingestuft werden. Freies, präzipitiertes Amphotericin B beeinträchtigt zusätzlich die Stabilität des Emulsionssystems. Starkes Schütteln oder Rühren, wie es bei der Hochdruckhomogenisation ermöglicht wird, erhöht deutlich die Einlagerung in die Lecithinschicht. Durch Zentrifugieren wird häufig präzipitierter Arzneistoff vom Arzneistoffträger abgetrennt. Am Beispiel beladener, homogenisierter Amphotericin B-Emulsionen wurde deutlich, dass das Trägersystem durch die starken Zentrifugalkräfte sehr stark beeinträchtigt wird. Durch die Wechselwirkungen der Bestandteile der flotierenden Ölphase wird zusätzlich zum freien Amphotericin B auch vorher in den Öltröpfen gebundenes Amphotericin B freigesetzt. Mit dieser Methode kann mit den gewählten Zentrifugationsparametern am Beispiel beladener Amphotericin B-Emulsionen nicht nachgewiesen werden, wie viel Arzneistoff gebunden wird. Möglicherweise war die Zentrifugalkraft zu hoch gewählt. Durch die Hochdruckhomogenisation kann mehr als 0,4 mg/mL Amphotericin B in die Lecithinschicht inkorporiert werden, idelaerweise 1 mg/mL oder mehr.

4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Entwicklung eine Emulsion weitergeführt werden, die den Arzneistoff Amphotericin B enthält und diesen stabilisiert. Es konnten durch die Untersuchungen detaillierte Erkenntnisse zur weiteren Charakterisierung des Arzneistoffs und der beladenen Emulsionen erlangt werden.

Theoretisch kann Amphotericin B in den Ölkern der Emulsionstropfen oder in die Grenzschicht zwischen Öl und Wasser eingelagert werden. Da der Arzneistoff aber weder eine ausreichende Löslichkeit in den Ölen noch in Wasser aufzuweisen hat (zwischen $< 0,1$ und $0,6$ mg/L), kann davon ausgegangen werden, dass der Arzneistoff wegen seines amphiphilen Charakters in die Lecithinschicht inkorporiert wird, wie von Washington et al. (Washington et al., 1988) postuliert wurde. Strukturelle Untersuchungen, wie z.B. TEM- und EM-Aufnahmen und CD-Spektroskopie, bestätigten, dass es möglich ist, Amphotericin B dort zu verkapseln (Egito, 2002; Muller et al., 2004). Egito geht davon aus, dass eine Interaktion von Amphotericin B mit den Emulsionstropfen vorliegt. Dieses Reservoir setzt Amphotericin B in der monomeren Form frei, so dass immer nur ein geringer Amphotericin-Teil frei vorliegt und dadurch auch die geringere Toxizität der Formulierung erklärt werden kann.

Auf der Basis der Ergebnisse von Schmidt (2002) wurde eine Formulierungsoptimierung durchgeführt. Die Ergebnisse waren z.T. sehr erfolgreich. Nach der Dampfdrucksterilisation der Amphotericin B-Emulsionen konnte ein Arzneistoffgehalt bis über 95% erreicht werden. In der Untersuchung der Stabilisierungseigenschaften verschiedener Lecithine stellte sich heraus, dass der Einschluss von Amphotericin B in der Lecithinschicht sehr wohl von den verwendeten Lecithinen beeinflusst wird. Im Gegensatz zu hydrierten Lecithinen und Eilecithin bot Sojalecithin keine Stabilisierung, sondern förderte sogar die Zersetzung von Amphotericin B. Weitere grundlegende Untersuchungen zum Einlagerungsverhalten von Amphotericin B und zur Stabilisierung in der Lecithinschicht werden zur Aufklärung der Lecithin-Arzneistoff-Wechselwirkung beitragen können. Des Weiteren gab es Hinweise, dass ein Eilecithingehalt von 0,6% nicht ausreicht, den dispergierten Arzneistoff und gleichzeitig die Öltropfen zu stabilisieren. Eine Eilecithinkonzentration von 0,8% besitzt ein gutes Stabilisierungspotential. Eine weitere Erhöhung der Lecithinmenge erwies sich nicht als Vorteil. Dasselbe galt für die Veränderung der Anzahl der Homogenisationszyklen der Standardzyklenzahl 10 bei einem Druck von 600 bar bei 45 °C. Eine weitere Reduzierung oder Erhöhung der eingebrachten Energie erzielte keine zusätzliche Stabilisierung.

Ein zunehmender Glycerolgehalt in der Amphotericin B-Suspension verminderte den Flockungsgrad. Allerdings wurde dadurch der Schutz vor Zersetzung während des Autoklavierens nicht erhöht.

Grundsätzlich zeigten alle Emulsionen während und nach der Herstellung und Sterilisation der Amphotericin B-Emulsionen eine gute physikalische Stabilität.

Aus den Beobachtungen während der Optimierung ging hervor, dass bei dem Einsatz von Lipofundin[®] MCT 10% (0,8% Eilecithin) als Ausgangsemulsion und den Herstellungsparametern von 600 bar, 45 °C und 10 Zyklen eine gute Stabilisierung des Arzneistoffs erreicht werden kann, was ein Amphotericin B-Gehalt von über 97% nach dem Autoklavieren bewies. Die Streuung der Ergebnisse (79-98%) war eher unbefriedigend. Der destabilisierende Faktor muß noch identifiziert werden. Die erprobten Ausgangssubstanzen (Eilecithin, Lipofundin[®] MCT 10%) und die moderaten Herstellungsbedingungen eignen sich sehr gut für eine Amphotericin B-Emulsion. Sie wurden daher für weitere detaillierte Untersuchungen herangezogen. Eine vergleichende Untersuchung verschiedener handelsüblicher Fettemulsionen bekräftigte das gute Einlagerungsvermögen der Emulsionen mit einem Ölkern aus 50% MCT und 50% LCT.

Erste In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen bestätigten die Vermutung, dass diese innovativen Emulsionen eine Alternative zu dem sehr teuren AmBisome[®] darstellen. Die untersuchten Emulsionen mit 10 und 20% Fettgehalt (0,8 und 1,2% Eilecithin) zeigten nach dem Autoklavieren keinen Wirkungsverlust. Ein möglicher Wirkungsverlust der Emulsionen gegenüber Fungizone[®] konnte durch eine Wirkungssteigerung ausgeglichen werden. Eine Dosissteigerung von 0,75 auf 2 mg/kg KG und eine Therapieverlängerung von 3 auf 7 Tage erwiesen sich ebenfalls als positiv. Weitere Untersuchungen zur Toxizität und Wirkung mit größeren Probandenkollektiven sind für weitere Abschätzungen erforderlich.

Eine leichte Ernüchterung der bisherigen sehr erfolgreichen Resultate brachten die Ergebnisse der physikalischen und chemischen Langzeitstabilität über 6-12 Monate. Das Auskristallisieren von Amphotericin B aus der Lecithinschicht begann nach etwa 2 Monaten. Die Ursache für die Alterungserscheinungen wie Partikelwachstum, pH-Erniedrigung und Zetapotentialzunahme scheint in einer Kombination aus einer normalen Alterung parenteraler O/W-Emulsionen ohne Arzneistoff und dem Auskristallisieren des eingelagerten Arzneistoffs zu liegen.

Eine vergleichende Betrachtung der chemischen Stabilität der Amphotericin B-Nanosuspensionen und -Emulsionen führten zu der Theorie eines Schutzmantels aus

zerstörtem Amphotericin B, der über den schützenden Lecithineffekt hinaus die Nanosuspensionen, in geringem Maße auch die Emulsionen vor einer schnellen Zersetzung schützt. Bestätigt wurde diese Theorie durch Sterilisationsversuche unter verschiedenen Bedingungen von Pulver, Nanosuspension und Emulsion und durch die Ergebnisse der Langzeitstabilität. Die Dampfdrucksterilisation wirkte sich verzögernd auf den Arzneistoffabbau aus. Bei Emulsionen scheint aber der primäre Schutzmechanismus in der Beschaffenheit der Monoschicht aus Lecithin zwischen Öl und Wasser zu liegen. Die Ergebnisse der chemischen Langzeitstabilität bekräftigten vorherige Beobachtungen, nämlich dass die Wahl der Lecithinart und -menge eine sehr unterschiedliche Stabilisierung ermöglicht. Eilecithin in einer Konzentration von 0,8% in Lipofundin[®] MCT 10% konnte einen sehr guten Schutz bieten. In den nicht autoklavierten Proben wurde nach 12 Monaten ein Gehalt von 75-98% Arzneistoff detektiert. Weitere Untersuchungen in der Zukunft werden sich damit beschäftigen müssen, wie das vereinzelte Auskristallisieren des Arzneistoffs verhindert werden kann. Ein möglicher Ansatz wäre die Erniedrigung der Amphotericin B-Konzentration in den Emulsionen auf 0,5 mg/mL.

Untersuchungen der Sättigungslöslichkeit von Amphotericin B in Wasser und Ölen bestätigten die praktische Unlöslichkeit von Amphotericin B, welche zwischen < 0,1 und 0,6 mg/L liegt, abhängig von Temperatur und Medium. Durch Herstellen einer Suspension konnte die Sättigungslöslichkeit auf 46-53 mg/L (24 °C und 5 °C) erhöht werden. Diese ausgeprägte Löslichkeitssteigerung kann sowohl durch die Partikelgrößenreduktion als auch durch den Zusatz von Eilecithin begründet werden. Sie bestätigte die Wahl der Hochdruckhomogenisation zur Herstellung der Emulsionen und Suspensionen.

Die verschiedenen Untersuchungen zur Temperaturempfindlichkeit des Arzneistoffs und der beladenen Emulsionen bestätigten die Gültigkeit, dass die Systeme möglichst mäßiger und kurzer Temperaturbelastung auszusetzen sind. Eine Lagerung im Kühlschrank kann sich als vorteilhaft erweisen.

Durch Untersuchung von Emulsionen, die durch einfaches Schütteln und durch Hochdruckhomogenisation hergestellt wurden, bestätigte sich die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass durch einfaches Schütteln hergestellte Emulsionen durch den hohen präzipitierten Arzneistoffanteil als nicht sicher eingestuft werden müssen. Weiterhin zeigte sich, dass die Technik der Zentrifugation nicht gewählt werden kann, um die in die Emulsion inkorporierte Menge an Amphotericin B zu bestimmen. Durch die Zentrifugalkräfte wird zuvor in der Lecithinschicht gelöster Arzneistoff ausgefällt.

Auf der Basis von O/W-Emulsionen wurde die Basis für eine vielversprechende Amphotericin B-Formulierung entwickelt, die die Vorteile eines „ready-to-use-Produkts“, eine gute Verträglichkeit sowie Wirkung mit sich bringt und somit eine preisgünstige Alternative zu den bisherigen Formulierungen darstellt. Das Potential dieses innovativen Emulsionssystems ist bisher nicht ausgeschöpft. Das Auskristallisieren aus der Lecithinschicht muss verhindert und eine dauerhafte, reproduzierbare physikalische und chemische Stabilität gewährleistet werden. Weitere Untersuchungen aus systematischer, physiko-chemischer und toxikologischer Sicht sind nötig, um das Emulsionssystem weiter zu erforschen, das Einlagerungsverhalten von Amphotericin B in die Lecithinschicht besser zu verstehen und die Stabilität zu optimieren.

Eine mögliche Optimierung als langzeitstabile Emulsion wäre eine Formulierung mit einer Konzentration von 0,5 mg/mL. Dabei würde sich bei einer Therapie mit 0,75-2 mg/kg KG Amphotericin B bei einem Erwachsenen ein Infusionsvolumen von 106-280 mL ergeben. Alternativ wäre eine Herstellung einer höher konzentrierten Amphotericin B-Emulsion als Rezeptur bzw. Defektur in einer Krankenhausapotheke denkbar, da eine Mindeststabilität von einem Monat gewährleistet ist.