

7 Zusammenfassung der Arbeit

Die vorliegende Dissertation untersuchte Möglichkeiten und Grenzen der SolEmuls[®]-Technologie anhand von drei Arzneistoffen, die gleichzeitig aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften Modellcharakter haben, aber auch Relevanz für die Therapie besitzen. Die SolEmuls[®]-Technologie ermöglicht es durch Ko-Homogenisation von Emulsionen und Arzneistoffpulver, den Arzneistoff in die Grenzfläche der Emulsion einzulagern, ohne hierfür - wie vorher üblich - organische Lösungsmittel einzusetzen. Sie ist daher prädestiniert, Emulsionen mit Arzneistoffen zu beladen, die sowohl in der Wasserphase als auch in der Ölphase der Emulsion unlöslich sind. Klassisches Beispiel hierfür ist der Arzneistoff Amphotericin B, der aufgrund seiner Bedeutung im Mittelpunkt dieser Arbeit stand. Amphotericin B ist eine bei Raumtemperatur feste Substanz, die durch ihre Unlöslichkeit in beiden Phasen charakterisiert ist. Als weiterer Arzneistoff wurde in der Arbeit Xenon untersucht. Xenon ist eine Substanz die zu einem geringen Anteil in Ölen löslich ist, wobei zu Beginn der Arbeit aufgrund der Datenlage vermutet wurde, dass für die Beladung von i.v. Emulsionen ebenfalls die Grenzfläche eine bedeutende Rolle spielt. Hochdisperse Xenon-Emulsionen mit großer Grenzfläche lieferten die besten In-vivo-Ergebnisse. Neben dem Modellcharakter hat Xenon auch als potentielles, exzellent verträgliches Anästhetikum hohes Potential. Als dritter Arzneistoff wurde Omeprazol ausgewählt. Er besitzt ebenfalls eine gewisse Öllöslichkeit; es sollten jedoch höher konzentrierte Emulsionen durch zusätzliche Einlagerung von Arzneistoff in die Grenzschicht hergestellt werden. Aspekt dieses Teils der Arbeit war zu untersuchen, in wieweit die Einlagerung in die Grenzflächen in der Lage ist, Arzneistoff zu stabilisieren. Unter diesem Gesichtspunkt war Omeprazol ein geeigneter Modellarzneistoff aufgrund seiner hohen chemischen Labilität und der Färbung der Zersetzungsprodukte, die bereits ein makroskopisches Screening aufgrund der Farbe der Emulsionen erlaubt.

Erste Amphotericin B-Emulsionen wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. Sven Schmidt durchgeführt. Die dortigen Arbeiten wurden in dieser Dissertation fortgesetzt, indem eine Zahl von Parametern mit potentieller Relevanz für die physikalische und chemische Stabilität der Amphotericin B-Emulsionen systematisch untersucht wurden. Ein wichtiger Parameter ist die Zahl der eingesetzten Homogenisationszyklen. Hier wurde zwar physikalische Stabilität bei allen eingesetzten Homogenisationszyklen, aber keine eindeutige Abhängigkeit der chemischen Stabilität von der Zyklenzahl festgestellt. Bisheriges

Herstellungsprinzip war der Zusatz von Arzneistoffpulver bzw. Nanosuspension zu einem bereits fertigen Handelsprodukt. Alternativ wurde in der vorliegenden Arbeit die de-Novo-Herstellung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass durch sie keine zusätzliche chemische Stabilisierung im Vergleich zu dem bisherigen Herstellungsprinzip erreicht wird. Ein wesentlicher Parameter ist die Feinheit des Ausgangsmaterials. Nach der SolEmuls[®]-Theorie führen die hohen Strömungsgeschwindigkeiten im Homogenisationsspalt zu einem sehr schnellen Auflösen des Arzneistoffpulvers. Ein weiterer, die Auflösungsgeschwindigkeit bestimmender Faktor ist die Partikeloberfläche, d. h. bei Verwendung eines feineren Ausgangsmaterials in Form einer Nanosuspension werden weniger Homogenisationszyklen benötigt, was für eine spätere potentielle industrielle Produktion sehr günstig wäre. Amphotericin B-Nanosuspensionen waren dadurch charakterisiert, dass sie zwar fein waren, jedoch zu Aggregation neigten. In der Arbeit wurde daher untersucht, in wieweit sich Aggregation der Kristalle als störend auswirkt. Hierzu wurden optimierte Amphotericin B-Nanosuspensionen unter Einsatz von Glycerol entwickelt. Optimale Nanosuspensionen ergaben sich bei einem Glycerolgehalt von 60%. Als Ergebnis der Studie konnte festgestellt werden, dass eine potentielle Aggregation von Nanokristallen kein produktionsbestimmender Faktor ist. In der vorliegenden Dissertation ergaben sich teilweise nach Herstellung bzw. einer gewissen Lagerzeit unterschiedliche Gehalte an Amphotericin B. Zur Abklärung dieses Effektes wurde auch der Einfluss der Temperatur auf die Emulsionen untersucht, z.B. bei Herstellung, über einen Zeitraum von 7 h sowie bei Sterilisation.

Wichtige Kriterien für eine potentielle Anwendung sind die physikalische und die chemische Langzeitstabilität. Amphotericin B-beladene Emulsionen wurden über einen Zeitraum von 6-12 Monaten eingelagert. Hierbei wurde festgestellt, dass die Emulsion selbst physikalisch stabil war, gegen Ende des Lagerzeitraums jedoch durch offensichtlichen Ausschluss von Arzneistoff aus der Lecithinschicht Kristallbildung auftrat. Zusammengefasst kann daraus gefolgert werden, dass eine Konzentration von 1 mg/mL kurzzeitstabil ist, für langzeitstabile Emulsionen sich jedoch eher eine Konzentration von 0,5 mg/mL empfiehlt. Intensiv untersucht wurde auch die chemische Stabilität durch Variation der Zusammensetzung der Lecithinschicht, z.B. Verwendung von Sojalecithin und hydrierten Lecithinen. Hier konnte eindeutig gezeigt werden, dass die chemische Zusammensetzung der Lecithinschicht einen entscheidenden Einfluss auf die chemische Stabilität hat. Bei Sojalecithin kam es im Sterilisationsprozess teilweise zur kompletten Zersetzung des Amphotericin B, während das bisher verwendete Eilecithin teilweise eine Wiederfindung von bis zu 98% ergab. Zur chemischen Stabilität kann abschließend gesagt werden, dass der Einfluss der

Zusammensetzung der Lecithinschicht nachgewiesen wurde, im Laufe der Arbeit jedoch bei identischen Herstellbedingungen noch Schwankungen im Amphotericin B-Gehalt während Sterilisation und Lagerung auftraten, die noch einer weiteren Klärung bedürfen. Hierzu werden derzeit in einer Folgearbeit spektroskopische Untersuchungen der Lecithinschicht durchgeführt, die die Zusammenhänge auf molekularer Ebene endgültig abklären sollen.

Wichtig für die Verwendung einer Amphotericin B-Emulsion sind die Verträglichkeit (d. h. potentielle Toxizität) sowie die biologische Wirksamkeit. In In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen konnte an Modellen (*Candida albicans* ATCC10231 und mit diesem Stamm infizierte Balb/c Mäuse) die biologische Wirksamkeit auch der sterilisierten Amphotericin B-Emulsionen nachgewiesen werden. Auch wurde in vivo keine Akuttoxizität gefunden, was aufgrund des Einsatzes der Fettemulsionen in der parenteralen Ernährung und der beschriebenen Reduktion der Nebenwirkungen durch Fettemulsionen zu erwarten war.

Am Ende der Arbeiten im Bereich Amphotericin B wurden auch Untersuchungen zur Bestimmung des in die Fettemulsion eingeschlossenen Anteils an Amphotericin B durchgeführt. Hierzu wurde der Zentrifugationstest eingesetzt. Als Ergebnis ist festzuhalten, dass der Zentrifugationstest, zumindest unter den angewandten Bedingungen, nicht geeignet ist, da er offensichtlich zur Verdrängung von Wirkstoff aus der Lecithinschicht bei Druckbelastung auf die Emulsionstropfen führt. Somit bleibt die Methode der Wahl die mikroskopische Untersuchung unverdünnter Emulsionen, bisheriges Standardverfahren zur Bestimmung größerer Partikel in parenteralen Emulsionen.

Beim Modellarzneistoff Xenon lagen erste erfolgreiche In-vivo-Studien mit hochfeinen Emulsionen vor. Diese Emulsionen wurden aus Handelspräparaten durch zusätzliche Homogenisation hergestellt und anschließend unter Druck von 2 bar mit Xenon beladen. In der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Größe der Grenzfläche als auch die Zusammensetzung der Stabilisatorschicht – entgegen der vorliegenden Arbeitshypothese aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. Georgieff – keine Rolle für den Beladungsgrad spielen. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die Arzneistofflöslichkeit bei nicht miteinander mischbaren bzw. wenig miteinander mischbaren Phasen rein additiv aus der Löslichkeit in den einzelnen Phasen zusammensetzt. Die bei der SolEmuls[®]-Technologie so wichtige Grenzfläche spielt daher bei diesen Emulsionen keine Rolle. Bei miteinander mischbaren Flüssigkeiten (z.B. das Öl LCT und Ethanol oder Wasser und Ethanol), kommt es zu keinem additiven Effekt. Da es sich um reale Lösungen handelt, kommt es zu einer Abweichung von der Additivität bei idealen Lösungen, leider in diesem Fall zu einer negativen Abweichung, d.h. bei Mischungen

der Komponenten zu einer Löslichkeitserniedrigung unter den rein theoretischen Wert. Als Ergebnis dieser Untersuchungen kann festgestellt werden, dass die ideale Emulsion zur Beladung mit Xenon aus Einzelkomponenten mit möglichst hoher Löslichkeit für Xenon zusammengesetzt sein muß, unter Verwendung eines gut verträglichen Emulgators wie Lecithin.

Aufgrund der Untersuchungen ergaben sich 7 Emulsionen für die In-vivo-Testung am Tiermodell (Schwein), z.B. mit der Zusammensetzung Abbolipid[®] 10% unter Zusatz von 4% Tween[®] 80. Diese Emulsion hatte in vivo auch den besten klinischen Effekt. Grundsätzliches Problem bei den In-vivo-Studien blieb jedoch die Abflutung über die Lunge; die in den In-vivo-Untersuchungen übliche Apnoe über 2 min lässt sich natürlich therapeutisch später am Menschen nicht durchführen. Das angestrebte Targeting mit den Emulsionen über Apolipoprotein E erwies sich in vivo als nicht effizient genug, eine ausreichende Menge Xenon in das Gehirn zu transportieren. Der Verlust bei der vorhergehenden Lungenpassage war bereits zu hoch. Somit können diese Systeme trotz optimierter galenischer Herstellung aufgrund der anatomischen Gegebenheiten (Verlust bei Lungenpassage) letztendlich keinen Einsatz finden.

Im letzten Teil der Arbeit wurde der Effekt einer möglichen chemischen Stabilisierung eines hochlabilen Wirkstoffes am Beispiel von Omeprazol untersucht. Emulsionen wurden mit 1 mg/mL, 2 mg/mL und 3 mg/mL beladen, wobei sich theoretisch 1 mg/mL in der Ölphase vollständig lösen musste. Die beiden anderen Emulsionen waren durch Einlagerung in die Lecithinschicht „übersättigt“. Bei 3 mg/mL war die Emulsion überladen, was durch Kristallbildung sichtbar wurde. Die mittlere, immer noch „übersättigte“ Konzentration von 2 mg/mL zeigte über den Untersuchungszeitraum kaum Kristallbildung. Als Ergebnis kann festgestellt werden, dass im Fall von Omeprazol unter Verwendung des hier eingesetzten Lecithins keine deutlichen Stabilisierungseffekte gefunden wurden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte das verwendete Lecithin bei Amphotericin B eine sehr gute Stabilisierung. Für zukünftige Arbeiten lässt sich aus den Ergebnissen folgern, dass es offensichtlich eine arzneistoffspezifische Interaktion mit den Stabilisatormolekülen gibt, d. h. spezifisch für jeden Arzneistoff muss ein Screening für eine optimale chemische Zusammensetzung der Stabilisatorschicht durchgeführt werden. Dabei wäre es zur kontrollierten Entwicklung ideal, wenn auch z.B. spektroskopische Methoden eingesetzt würden, um Molekülwechselwirkungen zu erfassen.