

## **6 Amphotericin B-Nanosuspensionen zur Therapie von *Balamuthia mandrillaris***

### **6.1 *Balamuthia mandrillaris***

Die Amöbe *Balamuthia mandrillaris* wurde erst 1990 entdeckt (Healy 2002; Schuster, Dunnebacke et al. 2003; Kiderlen and Laube 2004). Sie ist weltweit Verursacher letaler granulomatöser Amöbenenzephalitis (GAE) beim Menschen und anderen Säugetieren. Als Infektionswege kommen Tröpfcheninfektion und Hautläsionen in Betracht. Die Inkubationsdauer beträgt zwischen zwei Wochen bis zu mehreren Monaten. Bei Ausbruch der Erkrankung treten Gedächtnisstörungen, Krampfanfälle sowie Fieber und Kopfschmerzen auf. Die Patienten versterben an der Enzephalitis innerhalb von Tagen bis Monaten und die Diagnosestellung kann häufig erst post mortem durch Erregernachweis erfolgen. Infektionsschwerpunkte liegen in Nord- und Mittelamerika sowie Australien. Der nächstliegende Todesfall wurde 1998 in Tschechien beschrieben.

Da der Erreger erst 1990 entdeckt wurde, ist die Erkrankung im Vergleich zu anderen noch nicht so gut beforscht. Die Therapie der Erkrankung gestaltet sich als sehr schwierig, da auch hier wieder der Arzneistoff die Blut-Hirn-Schranke passieren muss. Bis heute sind nur zwei Fälle von Patienten bekannt, die eine Infektion mit *Balamuthia mandrillaris* überlebt haben. In beiden Fällen wurde ein ganzer Cocktail von Antibiotika verabreicht, u.a. Clarithromycin, Fluconazol und Sulfadiazin, von denen allerdings nicht alle einen Effekt gegen *Balamuthia mandrillaris* in vitro aufwiesen (Martinez and Visvesvara 2001).

In einem *in vivo*-Modell, das von Prof. Oliver Kayser durchgeführt wurde, konnte eine gute Wirksamkeit von Amphotericin B (AmB) auf den Amöbenstamm gezeigt werden. Es sollte nun analysiert werden, wie sich die Applikation einer AmB-Nanosuspension auf Mäuse auswirkt, die mit *Balamuthia mandrillaris* infiziert wurden. Mit einer

2-D PAGE-Studie wurde die Adsorption der Plasmaproteine durchgeführt. Hier wurde spezielles Augenmerk auf die für den Übertritt über die Bluthirnschranke relevanten Plasmaproteine ApoA-I, ApoE und ApoJ gelegt.

## 6.2 Amphotericin B

Das Polyenantibiotikum Amphotericin B (AmB) kann pharmakologisch in die Gruppe der Antimykotika eingeordnet werden. Es wird seit 1955 aus Kulturfiltraten von *Streptomyces nodosus* kultiviert. Die Strukturformel von AmB zeigt Abbildung 38.

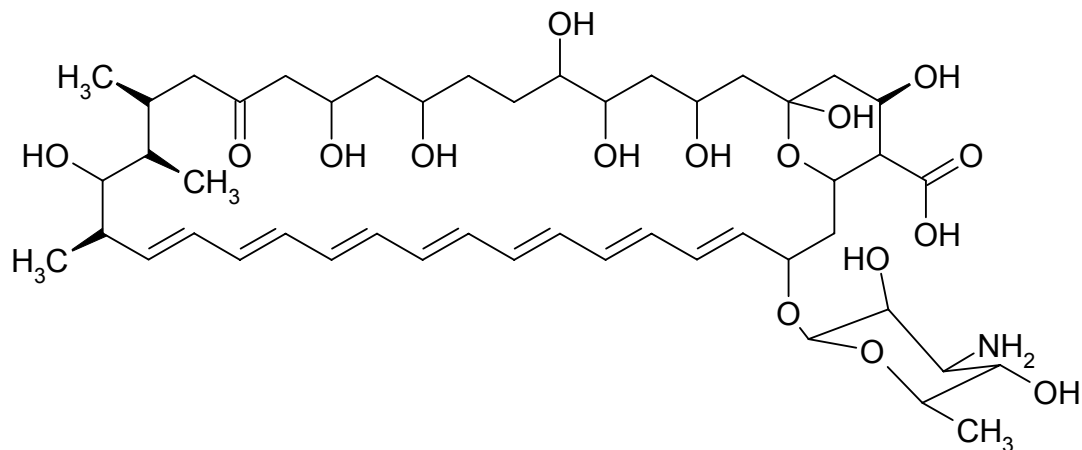


Abbildung 38: Strukturformel von Amphotericin B

AmB ist ein Heptaen mit ausgeprägten amphoteren Eigenschaften. Dies gab dem Molekül seinen Namen. AmB kann im sauren und im basischen Salze bilden (Budavari 1996), die in Wasser zwar besser löslich sind als die Grundsubstanz, jedoch über weniger ausgeprägte antimykotische Eigenschaften verfügen (Plumb 1999). Bei neutralem pH-Wert ist AmB wasserunlöslich.

AmB ist die wirksamste Therapie bei allen tiefen systemischen Organmykosen. Auf den beschriebenen amphiphilen Eigenschaften begründet sich der Wirkmechanismus von AmB. Es lagert sich mit seiner hydrophoben Komponente an

das in der Zellmembran von Pilzen vorkommende Ergosterol an und bildet mit diesem Komplexe. Dadurch verliert die Zellmembran ihre Fähigkeit zur Erhaltung des Protonengradienten.

Neben den antimykotische Eigenschaften zeigt AmB einen ausgeprägten antiprotozoischen Effekt. Deshalb wird es unter anderem auch zur Therapie gegen Parasiten der Gattung *Leishmania* eingesetzt. Allerdings gewinnt es auch zunehmend an Bedeutung bei der Therapie von Protozoenerkrankungen (Phillipson and Wright 1991; Kayser, Kiderlen et al. 2003).

AmB ist das einzige Polyen-Antimykotikum, das intravenös (i.v.) verabreicht werden kann. Insbesondere zur Therapie von Patienten, mit *Balamuthia mandrillaris* infiziert sind, ist es nötig, Arzneiformen zu entwickeln, die das ZNS erreichen. Aufgrund der geringen Löslichkeit von AmB liegt es nahe, hier eine Nanosuspension herzustellen, die in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Auch hier sollte durch Inkubation mit unterschiedlichen Polysorbaten und Poloxamer 188 über gezielte Anlagerung von Plasmaproteinen ein Transport über die Blut-Hirn-Schranke erreicht werden.

Der große Nachteil bei einer systemischen Verabreichung von AmB ist die relativ große Toxizität. Zum einen wirkt AmB stark zellschädigend, da es auch sehr starke Affinität zu Cholesterol besitzt, zum anderen ist besonders die gravierende Nephrotoxizität zu erwähnen.

## **6.3 Herstellung und Prüfung der Nanosuspensionen.**

### **6.3.1 Herstellung**

Die Nanosuspensionen wurden von Herrn Andreas Lemke am Institut für Pharmazie in Berlin hergestellt. Die Konzentration an AmB betrug 2%, die des eingesetzten Tensids 1%. Zur Herstellung wurde Aqua ad injectabilia verwendet. Es wurde zunächst ein Prämix am Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Deutschland) hergestellt. Anschließend wurden die Nanosuspension durch Hochdruckhomogenisation (Micron

LAB 40 Homogenisator, APV Gaulin, Unna) durch 20 Zyklen bei 1500 bar/RT hergestellt.

### **6.3.2 Partikelgrößenanalytik**

Die Partikelgrößen wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und Laserdiffraktometrie (LD) am Tag der Herstellung und nach einer Woche ermittelt.

Tabelle 20 zeigt die unterschiedlichen Zusammensetzungen mit den entsprechenden Partikelgrößen an Tag null und am siebten Tag. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Nanosuspensionen 1-4, bei denen überwiegend Na-Cholat mit einem Tensid gemischt war, deutlich größere Partikelgrößen aufwiesen als die übrigen. Dieses Phänomen lässt sich technologisch nicht erklären.

Da die NS 1-4 und 5-7 an unterschiedlichen Tagen hergestellt wurden, liegen die Gründe wohl eher an unterschiedlichen Leistungen des eingesetzten Hochdruckhomogenisators. Da für die Tierstudie die Nanosuspension nochmals hergestellt werden sollte, wurden die Daten, die mittels 2-D PAGE gewonnen wurden stärker gewichtet als die Partikelgrößen.

## Herstellung und Prüfung der Nanosuspensionen.

Tabelle 20: Partikelgrößen der unterschiedlichen AmB-Nanosuspensionen, P: Polysorbat, PF: Pluronic F127, Ch: Natriumcholat

<b>d=0</b>	<b>P 20 + Ch</b>	<b>P 80 + Ch</b>	<b>PF127+Ch</b>	<b>PF127</b>	<b>P 20</b>	<b>P 80</b>	<b>Ch</b>
<b>NS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>LD [µm] 50</b>	0,972	0,800	0,091	0,568	0,132	0,133	0,104
<b>95</b>	2,202	2,315	2,284	2,320	0,408	0,418	0,283
<b>99</b>	2,519	2,596	2,659	2,640	0,540	0,584	0,344
<b>100</b>	3,206	3,206	3,519	3,519	0,953	1,149	0,496
<b>PCS [nm]</b>	1033,5	1115,8	396,7	645,2	320,3	232,2	214,4
<b>PI</b>	0,307	0,402	0,242	0,497	0,347	0,324	0,216
<b>Zeta</b>	14,8	20,1	23,2	21,6	18,8	19,9	26,5
<b>d=7</b>							
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
<b>LD [µm] 50</b>	0,987	0,855	0,075	0,537	0,135	0,132	0,093
<b>95</b>	2,231	2,303	2,088	2,298	0,532	0,453	0,257
<b>99</b>	2,54	2,587	2,556	2,635	1,471	0,717	0,304
<b>100</b>	3,206	3,206	3,519	3,519	3,206	1,520	0,412
<b>PCS[nm]</b>	1100,2	1047,8	364,0	557,2	283,9	225,1	266,1
<b>PI</b>	0,275	0,549	0,151	0,454	0,201	0,277	0,113
<b>Zeta</b>	20,8	22,3	25,1	24,5	25,2	27,3	31,0

## 6.4 2-D PAGE

Für die Versuche wurden jeweils eine Menge AmB-Nanosuspension deren Gesamtoberfläche  $0,3 \text{ m}^2$  entsprach in  $2,2 \text{ ml}$  Mausplasma inkubiert. Anschließend wurde je dreimal mit  $1 \text{ ml}$  bidestilliertem Wasser gewaschen.  $100 \mu\text{l}$  der entstandenen Prüflösung wurden dann mit 2-D PAGE untersucht. Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Versuche.

Tabelle 21: Proteinadsorptionsmuster von unterschiedlichen AmB-Nanosuspensionen in [%Vol], n=2

	<b>P 80 + Ch</b>	<b>P 20 + Ch</b>	<b>PF127 + Ch</b>	<b>PF 127</b>	<b>P 80</b>	<b>P 20</b>	<b>Ch</b>
Albumin	$3,4 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,4$	$12,5 \pm 1,3$	$3,1 \pm 2,8$	$0,7 \pm 0,53$	$0,7 \pm 0,01$	$4,5 \pm 1,27$
<b>ApoA-I</b>	<b><math>7,8 \pm 0,5</math></b>	<b><math>6,9 \pm 4,1</math></b>	<b><math>2,6 \pm 0,4</math></b>	<b><math>4,3 \pm 0,1</math></b>	<b><math>5,7 \pm 0,2</math></b>	<b><math>5,0 \pm 0,4</math></b>	<b><math>3,3 \pm 1,8</math></b>
<b>ApoA-IV</b>	<b><math>2,2 \pm 0,1</math></b>	<b><math>2,5 \pm 1,5</math></b>	<b><math>2,7 \pm 1,5</math></b>	<b><math>3,1 \pm 1,7</math></b>	<b><math>3,0 \pm 0,1</math></b>	<b><math>1,5 \pm 0,7</math></b>	<b><math>2,8 \pm 1,6</math></b>
ApoC-III	$2,2 \pm 1,0$	$1,7 \pm 1,1$	$1,7 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,8$	$0,9 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,1$	-
<b>ApoE</b>	<b><math>4,5 \pm 0,1</math></b>	<b><math>2,4 \pm 1,9</math></b>	-	-	<b><math>1,6 \pm 0,1</math></b>	<b><math>0,8 \pm 0,2</math></b>	-
<b>ApoJ</b>	<b><math>5,4 \pm 3,3</math></b>	<b><math>1,4 \pm 1,2</math></b>	<b><math>3,9 \pm 0,3</math></b>	<b><math>1,7 \pm 1,2</math></b>	<b><math>6,5 \pm 3,2</math></b>	<b><math>1,6 \pm 0,8</math></b>	<b><math>3,2 \pm 0,4</math></b>
Fibrinogen	$1,7 \pm 8,3$	-	$16,7 \pm 1,5$	$19,2 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$
IgG $\gamma$	$18,9 \pm 8,3$	$29,7 \pm 0,4$	$28,0 \pm 0,9$	$20,0 \pm 0,2$	$31,1 \pm 0,1$	$27,1 \pm 4,5$	$29,2 \pm 6,7$
Ig leichte Ketten	$38,5 \pm 9,6$	$29,8 \pm 5,9$	$15,8 \pm 0,2$	$27,3, \pm 9,0$	$39,7 \pm 4,3$	$48,9 \pm 13,44$	$40,4 \pm 0,5$
IgM	$9,3 \pm 5,1$	$11,1 \pm 10,6$	$8,4 \pm 0,9$	$7,2 \pm 2,0$	$4,1 \pm 1,3$	$6,0 \pm 4,6$	$5,1 \pm 0,3$
Plasminogen	$2,1 \pm 1,0$	$2,4 \pm 1,4$	$2,4 \pm 1,9$	$3,9 \pm 1,9$	$1,8 \pm 0,3$	$1,5 \pm 1,0$	$1,3 \pm 0,4$

In Tabelle 21 sind die Proteinadsorptionsmuster der sieben unterschiedlichen Nanosuspensionen dargestellt. Bezug nehmend auf die von Lück et al. entwickelte Theorie war die Adsorption von ApoE von besonderem Interesse. Ferner wurde die Adsorption von ApoA-I und ApoA-IV sowie ApoJ mit berücksichtigt. Anhand der

vorliegenden Daten wurde die Nanosuspension 1 für die Tierstudie ausgewählt, da ApoE mit 4,5%Vol und ApoJ mit 5,4%Vol hohe Adsorptionwerte zeigten.

## 6.5 Tierstudie

Im Rahmen einer kleinen Tierstudie wurde auch hier getestet, ob die Formulierung in der Lage war, AmB in das Gehirn zu transportieren. Hierzu wurde die Nanosuspension fünf Mäusen mit einem Gewicht von ca. 20g nach folgendem Schema injiziert:

Die Mäuse wurden am Tag 7 nach Infektion mit je 400 µg AmB behandelt. Die Injektionen wurden alle zwei Tage wiederholt. Die Injektionen wurden in die Schwanzvene appliziert. Der AmB-Gehalt in den Organen wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt.

Tabelle 22: AmB-Gehalt in Leber, Nieren und Gehirn. Die Daten ergeben sich aus n=3 HPLC-Untersuchungen des gleichen Probenmaterials; n.d.= nicht detektierbar

Maus-Nr.	Amphotericin B Konzentration [µg/g]		
	Leber	Niere	Gehirn
803	15,2 ± 0,18	6,9 ± 0,32	0,2 ± 0,03
804	6,1 ± 0,21	1,4 ± 0,19	n.d.
805	4,8 ± 0,52	0,8 ± 0,17	n.d.
806	n.d.	n.d.	n.d.
807	27,6 ± 0,37	11,5 ± 0,24	0,6 ± 0,11

Maus 803 und 805 verstarben an Tag 8 (1 vollständige Injektion), Maus 804 verstarb am Tag 11 (2 vollständige Injektionen). Maus 806 verstarb unmittelbar nach der

ersten Injektion. Maus 807 wurde am Tag 23 nach 5 vollständigen Injektionen getötet.

Wie aus Tabelle 22 hervorgeht, konnte auch hier bei 2 Mäusen AmB im Gehirn nachgewiesen werden. Allerdings waren die Konzentrationen sehr klein. Die Ursache für das eher enttäuschende Ergebnis der Studie ist unklar. Eine anschließende Kontrolle der Nanosuspension ergab aber keinen Hinweis auf Partikelaggregation.

Allerdings hat die Studie bei den Mäusen, die länger überlebt haben erneut gezeigt, dass Arzneistoff über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden konnte. Wenn auch nur in sehr geringen Mengen. Deutlich mehr AmB fand sich hingegen in der Leber und in den Nieren. Die Konzentration in den Nieren war aber auch vergleichsweise niedrig, was im Hinblick auf die Nephrotoxizität des AmB als positiv gewertet werden kann.

## 6.6 Fazit

Auch hier ist es erneut gelungen mit Hilfe von Polysorbat 80 einen Arzneistoff über die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren. Ob allerdings die Menge, die im Gehirn nachgewiesen wurde als therapeutische Dosis ausreicht, darf bezweifelt werden. Diese Studie war ein erster Ansatz, einen Übertritt von AmB über die BBB nachzuweisen. Die Tierstudie war prinzipiell nicht sonderlich aussagekräftig, um hier eine abschließende und gesicherte Beurteilung zu treffen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass AmB-Nanosuspensionen zur i.v.-Injektion eher ungeeignet sind. Prinzipiell hat sich jedoch gezeigt, dass es möglich ist, mit Polysorbat 80 die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wenn auch nicht so erfolgreich und effektiv wie mit den Dox-beladenen PBCA-Partikeln. Allerdings waren die in Kapitel 5 diskutierten relevanten Plasmaproteinen, auf den AmB-Partikeln nicht in hohen Mengen adsorbiert.