

## 4 Ergebnisse

### 4.1. Paclitaxel auf Ballonkathetern

Um einer Restenosebildung nach Ballondilatation eines Herzkranzgefäßes vorzubeugen, kann der Wirkstoff Paclitaxel zur Verringerung des Risikos systemischer Nebenwirkungen lokal appliziert werden. Eine elegante Variante besteht darin, dies gleich während der Dilatation des Gefäßes zu tun, indem man einen mit Arzneistoff beschichteten Ballon verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ballone im Tauchverfahren beschichtet und der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Beschichtung untersucht. Variiert wurden Beschichtungszeiten und Beschichtungsintervalle, um den Einfluss von mehrmaligem Tauchen, der Tauchdauer und der Trocknungsdauer auf die Beschichtung zu bestimmen. Teilweise erfolgte ein Zusatz verschiedener Substanzen zur Beschichtungslösung, um die Haftung des Wirkstoffes am Ballon nach der Beschichtung beziehungsweise die Ablösung des Wirkstoffes vom Ballon an der Arterienwand zu verbessern. Untersucht wurden weiterhin die Einflüsse der Wirkstoffkonzentration der Beschichtungslösung und des Ballonfaltungszustandes auf die Beschichtung. Dazu wurden einige Ballone handelsüblich gefaltet beschichtet, andere Ballone zunächst expandiert und dann ungefaltet getaucht und eine dritte Gruppe erst über Wasserdampf sternförmig aufgefaltet und anschließend beschichtet (siehe Abbildungen 15-17, Seite 64).

#### 4.1.1. Tauchdauer und Trocknungszeiten

Wie unter 3.1.1. Versuch a) beschrieben, wurden die nach unterschiedlichen Tauchdauern an Ballonkathetern vom Typ Orbus IV haftenden Paclitaxelmengen bestimmt und mit der Wirkstoffmenge verglichen, die bei mehrfachem Tauchen und Trocknen auf den Ballonen erhalten wurde (Methode verwendet zur Beschichtung der Katheter von Scheller et al. [26]).

Nach dem Tauchen in die Beschichtungslösungen (20 mg/mL Paclitaxel in Aceton) wurden die Ballone an der Luft getrocknet. Die expandiert getauchten Ballone

mussten danach wieder gefaltet werden, bevor alle Ballone in Auffanggefäßen an der Luft voll expandiert werden konnten. Die Menge des dabei abgefallenen Wirkstoffes wurde ebenso mittels HPLC vermessen, wie die an dem Falzwerkzeug und auf dem Ballon verbliebenen Anteile des Paclitaxels (siehe Tabelle 3).

Unter der vereinfachenden Annahme, dass expandierte Ballonkatheter die Form eines geraden Kreiszyinders besitzen, ergibt sich für Katheter des Typs Obus IV (2,25 mm x 17 mm) eine Oberfläche von 128 mm<sup>2</sup>.

Tabelle 3: Versuch a) – Abhängigkeit der Beschichtung von der Tauchdauer

Ballonnummer	Art der Probe	Beschichtungs- dauer	Peakfläche Paclitaxel RT = 7,9 min	Konzentration Paclitaxel (µg/mL)	Paclitaxelmenge in der Probe (µg)	Paclitaxelmenge (mit abgefallenen Wirkstoff) pro mm <sup>2</sup> Ballonoberfläche (µg)
	Standard (20 µg/mL) in Ethanol		1.098.398	20,0		
1	gefaltet beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff	5 s	1.475.337 87.493	26,9 1,6	40,3 2,4	0,33
2	gefaltet beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff	5 s	1.006.182 254.672	18,3 4,6	27,5 7,0	0,27
3	gefaltet beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff	1 min	1.251.384 55.368	22,8 1,0	34,2 1,5	0,28
4	gefaltet beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff	1 min	1.667.839 67.729	30,4 1,2	45,6 1,8	0,37
5	gefaltet beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff	10 min	2.005.297 15.657	36,5 0,3	54,8 0,4	0,43
6	gefaltet beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff	10 min	2.206.781 20.341	40,2 0,4	60,3 0,6	0,48
7	expandiert beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff Faltwerkzeug	1 min	675.363 2.164 18.622	12,3 0,0 0,3	18,4 0,1 0,5	0,15
8	expandiert beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff Faltwerkzeug	1 min	536.716 3.158 29.495	9,8 0,1 0,5	14,7 0,1 0,8	0,12
9	expandiert beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff Faltwerkzeug	1 min + 3 x 5 s	1.925.877 25.943 7.952	35,1 0,5 0,1	52,6 0,7 0,2	0,42
10	expandiert beschichteter Ballon abgefallener Wirkstoff Faltwerkzeug	1 min + 3 x 5 s	1.850.369 4.109 74.058	33,7 0,1 1,3	50,5 0,1 2,0	0,41
11	expandierter Ballon abgefallener Wirkstoff Faltwerkzeug	unbeschichtet	- - -	0,0 0,0 0,0	0,0 0,0 0,0	0,00

Abbildung 7: Abhängigkeit der aufgetragenen Wirkstoffmenge von der Tauchdauer

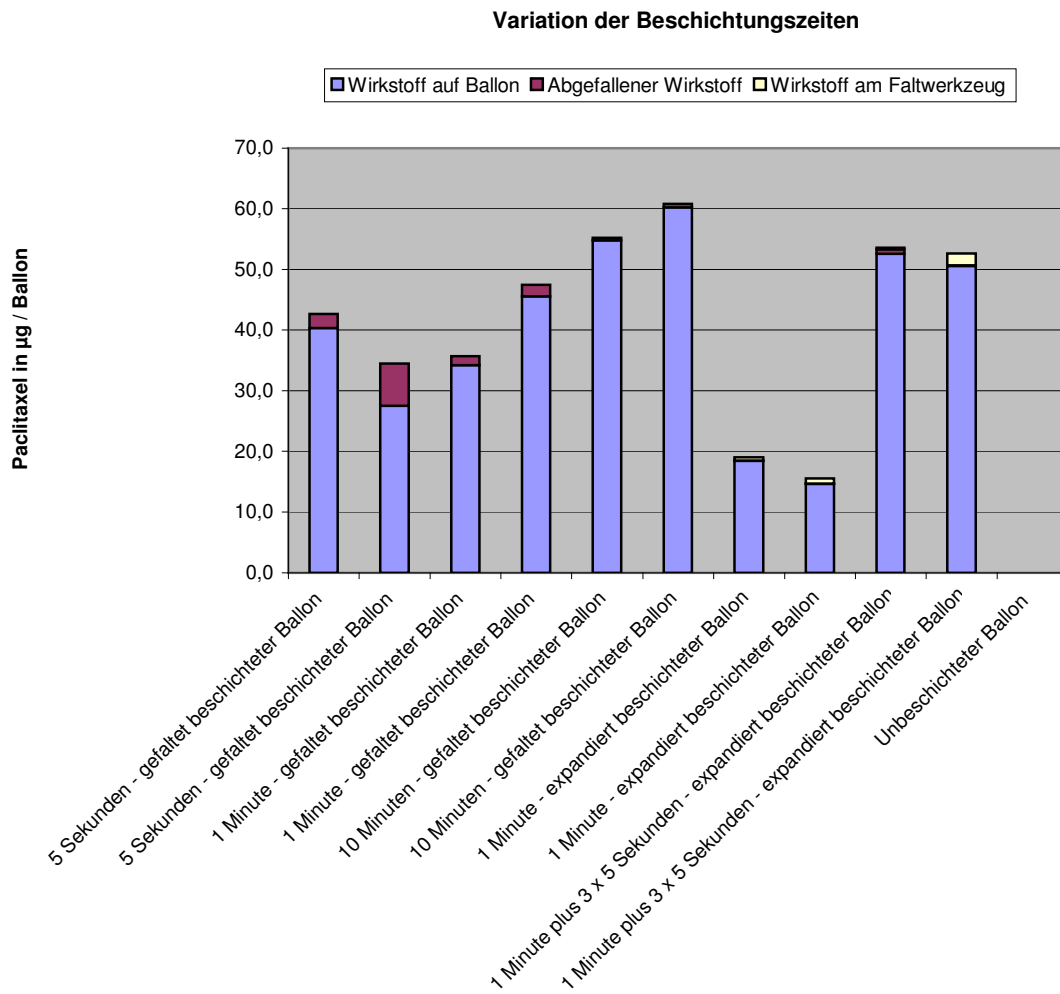
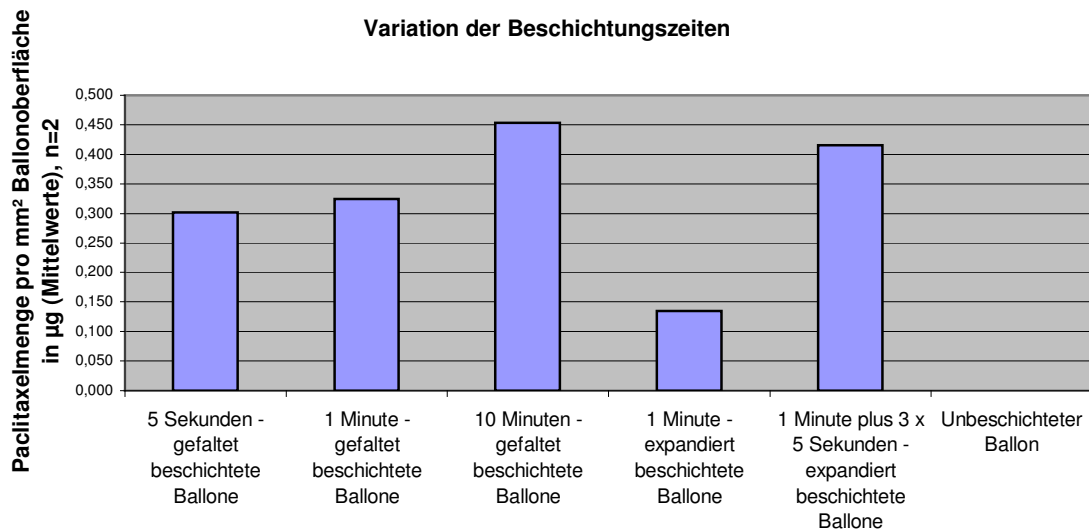


Abbildung 8: Abhängigkeit der pro mm<sup>2</sup> Ballonoberfläche aufgetragenen Wirkstoffmenge von der Tauchdauer



Vergleicht man die gefaltet beziehungsweise expandiert für jeweils 1 Minute getauchten Ballone miteinander, so stellt man fest, dass die gefaltet getauchten Ballone in dieser Zeit etwa die doppelte Paclitaxelmenge aufgenommen haben (siehe Abbildungen 7 und 8). Verantwortlich wird dafür die Wirkstoffablagerung in den Falten sein. Es zeigte sich weiterhin, dass bei den gefaltet getauchten Ballonen eine lange Tauchdauer (10 Minuten) deutliche Vorteile hinsichtlich der auf dem Ballon haftenden Paclitaxelmenge bringt (siehe Abbildungen 7 und 8). Als Ursache wird angenommen, dass der gelöste Wirkstoff mehr Zeit hat, in die Falten des Ballons einzudringen. Bei den expandierten Ballonen erhält man durch mehrfaches Tauchen (1 min plus 3 x 5 s) deutlich höhere Paclitaxelmengen auf der Ballonoberfläche als bei einmaligem 1-minütigem Tauchen (siehe Abbildungen 7 und 8). Durch den mehrfachen Wechsel zwischen Tauch- und Trockenphasen werden bei dieser Methode wahrscheinlich mehrere Schichten aufgetragen, die beim nächsten Tauchgang nicht oder nur teilweise wieder abgelöst werden. Die Menge des beim Expandieren der Ballone in Luft abgefallenen Paclitaxels war durchweg relativ gering und auch am Faltwerkzeug (Aufkleberpapier) verblieb nur wenig Wirkstoff (siehe Abbildung 7).

#### 4.1.2. Einflüsse von Ultravist®- bzw. Salicylsäure-Zusätzen zur Beschichtungslösung

Wie unter 3.1.1. Versuch b) beschrieben, wurde am Kathetertyp Orbus I - blau (3,5 mm x 20 mm) der Firma BMT untersucht, welchen Einfluss der Zusatz von in Ethanol gelöstem Ultravist® zur Beschichtungslösung auf die Beschichtung der Ballonkatheter hat.

Die gefalteten Ballone wurden einmalig 10 Minuten, die expandierten Ballone nach Standardmethode (siehe 3.3.1.) viermal in Paclitaxellösungen (20 mg/mL) mit unterschiedlichem Ultravist®-Gehalt getaucht. Mittels HPLC wurde die Menge des am Ballon haftenden Wirkstoffes ebenso ermittelt, wie die an faltwerkzeug und Schutzhülle verbleibenden bzw. beim Expandieren der Ballone in Luft abfallenden Anteile des Paclitaxels (siehe Tabelle 4).

Unter der vereinfachenden Annahme, dass expandierte Ballonkatheter die Form eines geraden Kreiszylinders besitzen, ergibt sich für Katheter des Typs Orbus I - blau (3,5 mm x 20 mm) ein Oberflächeninhalt von 239 mm<sup>2</sup>.

Tabelle 4: Versuch b) – Einfluss eines Ultravist®-Zusatzes auf die Beschichtung

Ballonnummer	Art der Probe  (Säule)	Ultravist® 300-Gehalt der Beschichtungslösung  in % (m/m)	Beschichtungsdauer	Peakfläche Paclitaxel  RT = 7,9 min	Konzentration Paclitaxel  (µg/mL)	Paclitaxelmenge in der Probe  (µg)	Paclitaxelmenge (mit abgefallenem Wirkstoff/ Plastikschutzhülle/ faltwerkzeug) pro mm <sup>2</sup> Ballonoberfläche (µg)
	Standard (20 µg/mL) in Ethanol Säule 1*			779.956	20,0		
	Säule 2*			676.712	20,0		
1	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2)	0	10 min	2.923.476 32.598	75,0 1,0	112,4 1,4	0,48
	Plastikschutzhülle (1)			12.207	0,3	0,5	
2	gefaltet beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (1)	0	10 min	3.048.522 0	90,1 0,0	135,1 0,0	0,57
	Plastikschutzhülle (2)			8.776	0,3	0,4	
3	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1)	0,03	10 min	3.715.126 23.063	95,3 0,6	142,9 0,9	0,60
	Plastikschutzhülle (2)			13.194	0,4	0,6	
4	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2)	0,03	10 min	4.404.768 75.238	112,9 2,2	169,4 3,3	0,72
	Plastikschutzhülle (2)			3.991	0,1	0,2	

Ballonnummer	Art der Probe  (Säule)	Ultravist® 300-Gehalt der Beschichtungs- lösung  in % (m/m)	Beschichtungs- dauer	Peakfläche Paclitaxel  RT = 7,9 min	Konzentration Paclitaxel  (µg/mL)	Paclitaxelmenge in der Probe  (µg)	Paclitaxelmenge (mit abgefallenem Wirkstoff/ Plastikschutzhülle/ Faltwerkzeug) pro mm <sup>2</sup> Ballonoberfläche (µg)
5	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	0,3	10 min	3.857.688 21.651 16.324	98,9 0,6 0,5	148,4 1,0 0,7	0,63
6	gefaltet beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1)	0,3	10 min	2.993.779 16.902 8.673	88,5 0,5 0,2	132,7 0,7 0,3	0,56
7	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (1)	3	10 min	4.566.284 35.909 0	117,1 0,9 0,0	175,6 1,4 0,0	0,74
8	gefaltet beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1)	3	10 min	3.059.207 63.986 54.756	90,4 1,9 1,4	135,6 2,8 2,1	0,59
9	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (2)	0	1 min plus 3 x 5 s	1.051.071 0 0	27,0 0,0 0,0	40,4 0,0 0,0	0,18
10	expandiert beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (2)	0	1 min plus 3 x 5 s	72.842 1.080.526 9.451 7.000 58.928	2,2 31,9 0,3 0,2 1,7	3,2 47,9 0,4 0,3 2,6	0,21
11	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (2)	0,03	1 min plus 3 x 5 s	1.092.392 0 0 81.666	28,0 0,0 0,0 2,4	42,0 0,0 0,0 3,6	0,19
12	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (2)	0,03	1 min plus 3 x 5 s	1.470.237 0 0 106.858	37,7 0,0 0,0 3,2	56,6 0,0 0,0 4,7	0,26
13	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (2)	0,3	1 min plus 3 x 5 s	1.147.774 0 4.624 120.333	29,4 0,0 0,1 3,6	44,1 0,0 0,2 5,3	0,21
14	expandiert beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (2)	0,3	1 min plus 3 x 5 s	1.174.356 0 3.200 120.802	34,7 0,0 0,1 3,6	52,1 0,0 0,1 5,4	0,24
15	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (2)	3	1 min plus 3 x 5 s	952.381 3.854 0 111.869	24,4 0,1 0,0 3,3	36,6 0,2 0,0 5,0	0,18
16	expandiert beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (2)	3	1 min plus 3 x 5 s	883.625 0 5.987 80.622	26,1 0,0 0,2 2,4	39,2 0,0 0,3 3,6	0,18
17	expandierter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (2)	unbeschichtet	unbeschichtet	0 0 0 0	0,0 0,0 0,0 0,0	0,0 0,0 0,0 0,0	0,00

\*Die Messungen erfolgten auf 2 HPLC-Anlagen.

Abbildung 9: Abhängigkeit der aufgetragenen Wirkstoffmenge vom Ultravist® 300-Gehalt der Beschichtungslösung

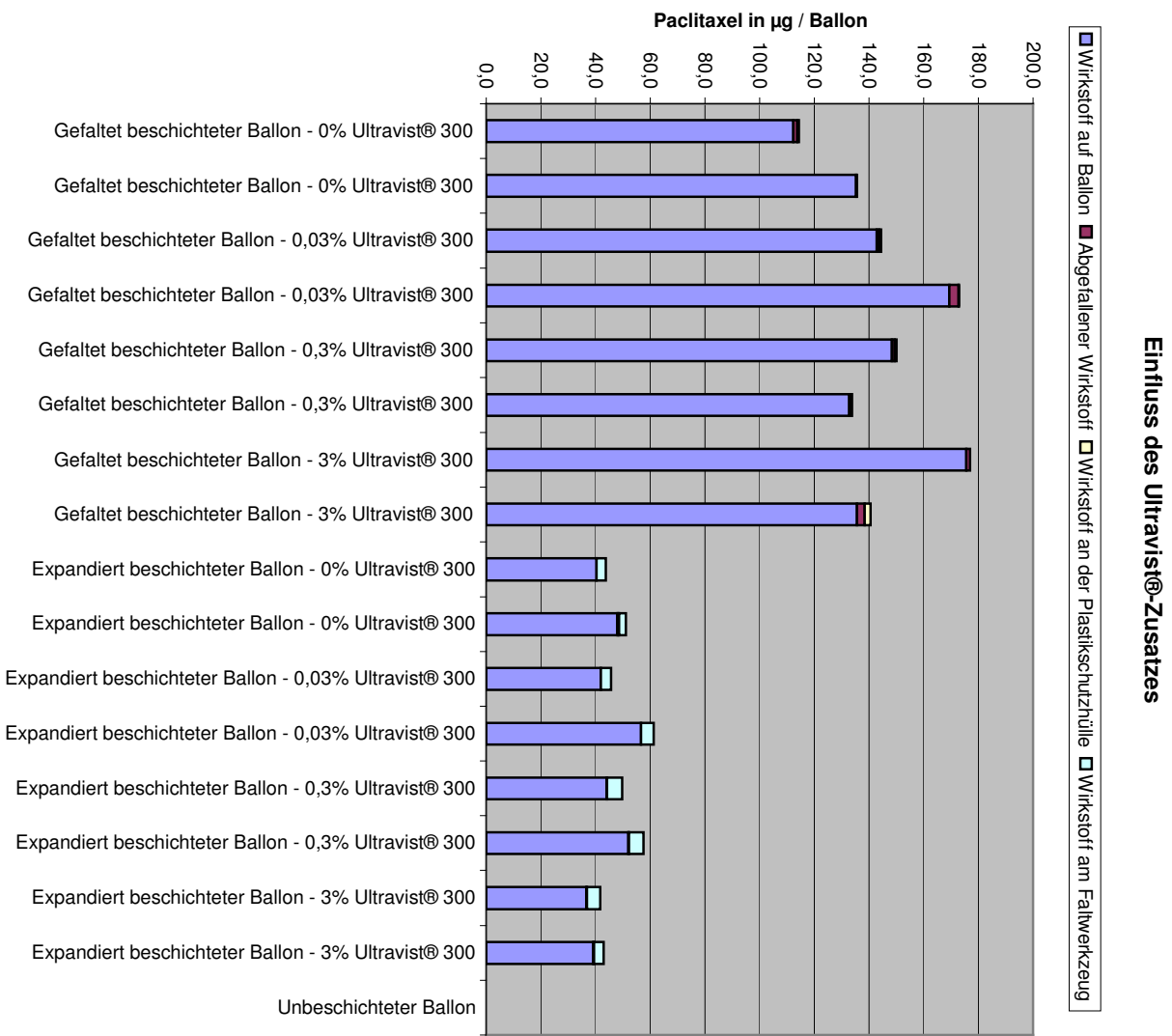
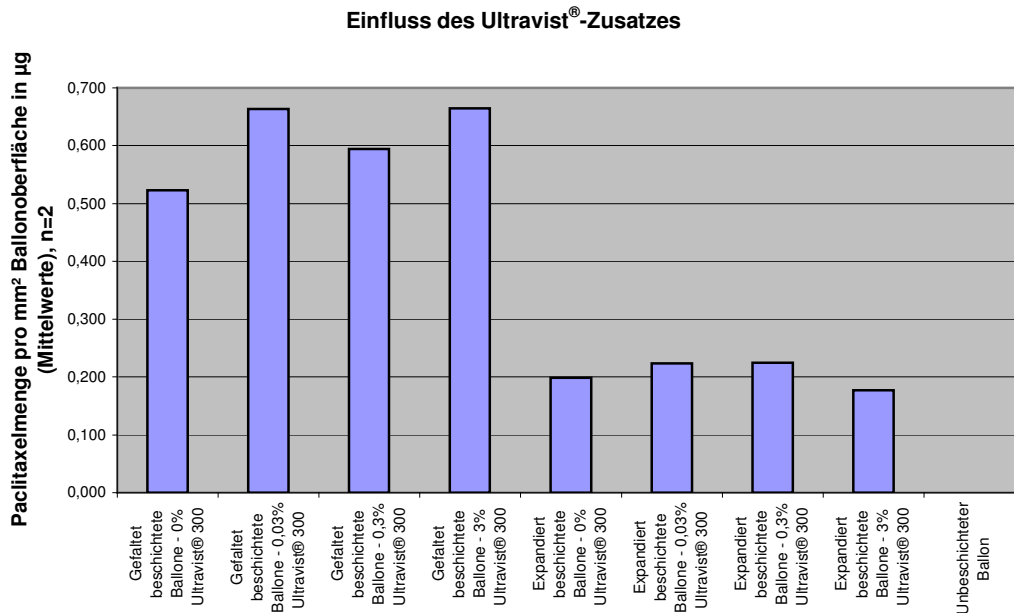


Abbildung 10: Abhängigkeit der pro mm<sup>2</sup> Ballonoberfläche aufgetragenen Wirkstoffmenge vom Ultravist® 300-Gehalt der Beschichtungslösung



Eine Abhängigkeit der auf die Ballonkatheter aufgetragenen Paclitaxelmenge vom Ultravist®-Gehalt der Beschichtungslösung wurde nicht nachgewiesen (siehe Abbildungen 9 und 10). Die aufgetragenen Wirkstoffmengen unterliegen vielmehr nur den versuchsbedingt zu erwartenden Schwankungen.

Verglichen mit den expandiert beschichteten Ballonen konnte bei Beschichtung im gefalteten Zustand etwa die dreifache Wirkstoffmenge aufgetragen werden (siehe Abbildungen 9 und 10). Durch anschließende Betrachtung der Ballone mittels Lupe wurde aber auch eine ungleichmäßigere Beschichtung der gefaltet getauchten Ballone festgestellt. Beides dürfte in der Wirkstoffanreicherung in den Falten begründet sein. Beim Expandieren in Luft fiel von den expandiert beschichteten Ballonen weniger Wirkstoff ab als von den gefaltet beschichteten Ballonen. Auf ihnen befand sich von vornherein weniger Wirkstoff, von dem etwa 5% bis 12% beim Zusammenfallen nach dem Tauchen und Trocknen auch noch am Faltenwerkzeug verblieben (siehe Abbildung 9). An den Plastikschutzhüllen wurde vergleichsweise wenig Wirkstoff (unter 1%) gefunden.



Wie unter 3.1.1. Versuch c) beschrieben, wurde an Kathetern vom Typ Orbus IV untersucht, welchen Einfluss ein Salicylsäurezusatz zur Beschichtungslösung auf die Beschichtung der Ballonkatheter hat.

Die gefalteten Ballone wurden einmalig 10 Minuten, die expandierten Ballone nach Standardmethode (siehe 3.3.1.) viermal in Paclitaxellösungen (20 mg/mL) mit unterschiedlichem Salicylsäuregehalt getaucht. Mittels HPLC wurde die Menge des am Ballon haftenden Wirkstoffes ebenso ermittelt, wie die an Falzwerkzeug und Schutzhülle verbleibenden bzw. beim Expandieren der Ballone in Luft abfallenden Anteile des Paclitaxels (siehe Tabelle 5).

Unter der vereinfachenden Annahme, dass expandierte Ballonkatheter die Form eines geraden Kreiszylinders besitzen, ergibt sich für Katheter des Typs Orbus IV (2,25 mm x 17 mm) ein Oberflächeninhalt von 128 mm<sup>2</sup>.

Tabelle 5: Versuch c) – Einfluss des Salicylsäurezusatzes auf die Beschichtung

Ballonnummer	Art der Probe  (Säule)	Salicylsäuregehalt der Beschichtungs- lösung  in % (m/m)	Beschichtungs- dauer	Peakfläche Paclitaxel  RT = 7,9 min	Konzentration Paclitaxel  (µg/mL)	Paclitaxelmenge in der Probe  (µg)	Paclitaxelmenge (mit abgefallenem Wirkstoff/ Plastikschutzhülle/ Faltwerkzeug) pro mm <sup>2</sup> Ballonoberfläche (µg)
	Standard (20 µg/mL) in Ethanol Säule 1* Säule 2*			789.292 645.318	20,0 20,0		
1	gefaltet beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2)	0	10 min	2.384.426 14.156 -	73,9 0,4 0,0	110,8 0,5 0,0	0,87
2	gefaltet beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2)	0	10 min	2.212.223 55.067 -	68,6 1,4 0,0	102,8 2,1 0,0	0,82
3	gefaltet beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2)	0,03	10 min	3.070.147 21.459 2.786	95,2 0,5 0,1	142,7 0,8 0,1	1,12
4	gefaltet beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	0,03	10 min	2.490.735 25.186 -	77,2 0,8 0,0	115,8 1,2 0,0	0,91
5	gefaltet beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	3	10 min	1.978.684 66.507 -	61,3 2,1 0,0	92,0 3,1 0,0	0,74
6	gefaltet beschichteter Ballon (2) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (1)	3	10 min	2.575.707 21.141 9.694	79,8 0,5 0,2	119,7 0,8 0,4	0,95
7	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (2)	0	1 min plus 3 x 5 s	757.660 - - 38.697	19,2 0,0 0,0 1,2	28,8 0,0 0,0 1,8	0,24
8	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (1)	0	1 min plus 3 x 5 s	651.375 - - 76.120	16,5 0,0 0,0 1,9	24,8 0,0 0,0 2,9	0,22
9	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (1)	0,03	1 min plus 3 x 5 s	690.315 - - 102.706	17,5 0,0 0,0 2,6	26,2 0,0 0,0 3,9	0,24
10	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (2)	0,03	1 min plus 3 x 5 s	647.250 2.191 10.658 59.196	16,4 0,1 0,3 1,8	24,6 0,1 0,5 2,8	0,22
11	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (1)	3	1 min plus 3 x 5 s	740.759 4.745 11.905 22.697	18,8 0,1 0,4 0,6	28,2 0,2 0,6 0,9	0,23
12	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (2)	3	1 min plus 3 x 5 s	857.291 4.792 - 18.102	21,7 0,1 0,0 0,6	32,6 0,2 0,0 0,8	0,26
13	expandierter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (2)	unbeschichtet	unbeschichtet	0 0 0 0	0,0 0,0 0,0 0,0	0,0 0,0 0,0 0,0	0,00

\* Die Messungen erfolgten auf 2 HPLC-Anlagen.

Abbildung 11 : Abhängigkeit der aufgetragenen Wirkstoffmenge vom Salicylsäure-Gehalt der Beschichtungslösung

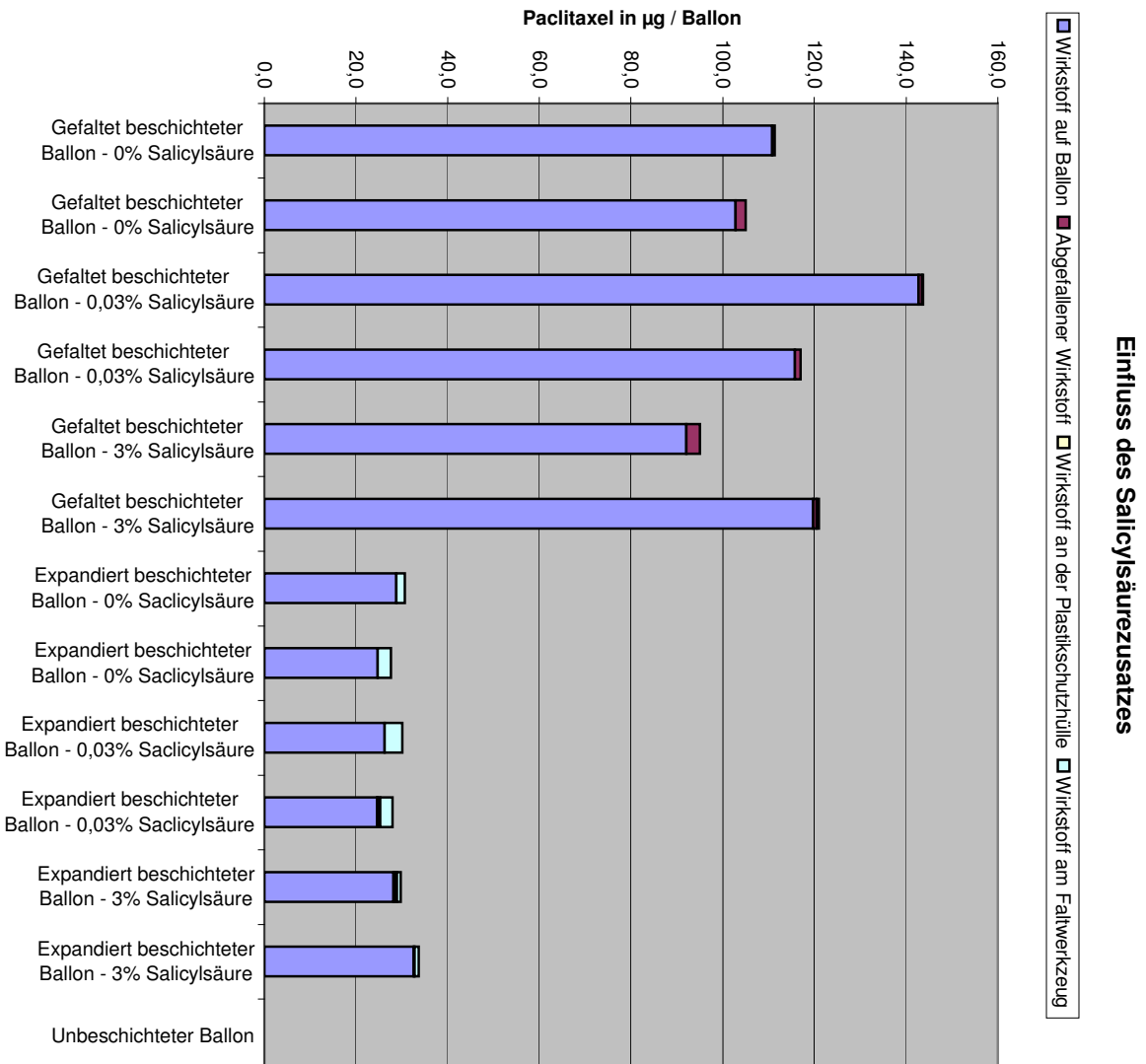
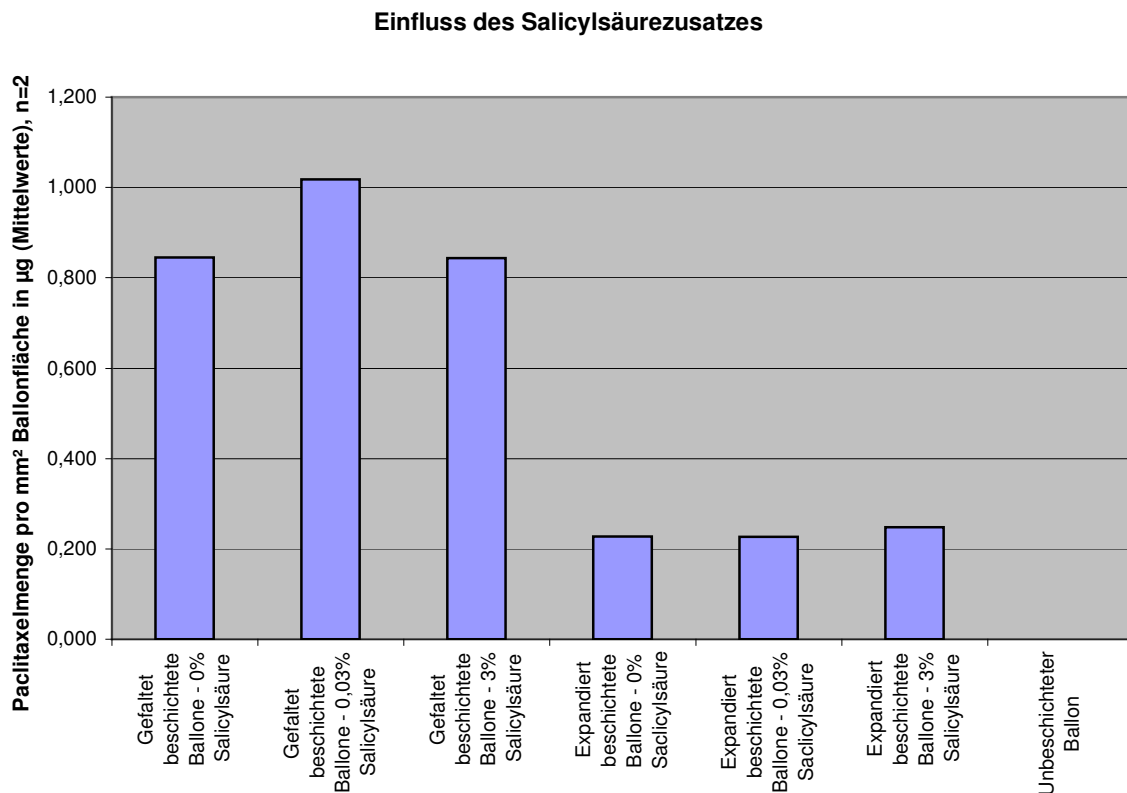


Abbildung 12: Abhängigkeit der pro mm<sup>2</sup> Ballonoberfläche aufgetragenen Wirkstoffmenge vom Salicylsäure-Gehalt der Beschichtungslösung



Ein Einfluss des Salicylsäurezusatzes auf die Menge des auf die Ballonkatheter aufgetragenen Paclitaxels konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 11 und 12), da die Unterschiede in den Messwerten nicht über die methodenbedingten Schwankungen hinausgingen.

Es zeigte sich ferner, dass auf die gefaltet getauchten Ballone etwa die 4-fache Menge Paclitaxel aufgetragen werden konnte (siehe Abbildungen 11 und 12), die Beschichtung aber auch deutlich ungleichmäßiger wirkte (Betrachtung mit Lupe) als bei den expandiert getauchten Ballonen. Beides dürfte darauf zurückzuführen sein, dass gelöster Wirkstoff in die Falten eindrang und sich dort beim Trocknen ablagerte und anreicherte. Allerdings gelang auch die Beschichtung der expandierten Ballone nicht völlig gleichmäßig. Der Grund dafür ist unbekannt. Beim erneuten Expandieren der expandiert beschichteten und anschließend gefalteten Ballone fiel weniger

Paclitaxel ab als beim Expandieren der gefaltet getauchten Ballonkatheter. Einerseits befand sich auf den expandiert beschichteten Ballonen ohnehin schon weniger Wirkstoff, von dem andererseits ein geringer Teil auch noch am Falzwerkzeug verblieb. An den Plastikschtzhüllen wurde ebenfalls nur wenig Paclitaxel gefunden (siehe Abbildung 11).

#### **4.1.3. Variation der Wirkstoffkonzentration der Beschichtungslösung**

Wie unter 3.1.1. Versuch d) beschrieben, wurde an Kathetern vom Typ Orbus IV untersucht, inwieweit sich unterschiedliche Paclitaxelkonzentrationen der Beschichtungslösungen auf die Menge des aufgetrachten Wirkstoffes auswirken.

Gefaltete Ballone wurden einmalig 10 Minuten oder nach Standardmethode (siehe 3.3.1.) viermal, die expandierten Ballone nach Standardmethode (siehe 3.3.1.) viermal in Paclitaxellösungen unterschiedlicher Konzentrationen (20 mg/mL, 50 mg/mL bzw. 100 mg/ml) getaucht. Mittels HPLC wurde die Menge des am Ballon haftenden Wirkstoffes ebenso ermittelt, wie die an Falzwerkzeug und Schutzhülle verbleibenden bzw. beim Expandieren der Ballone in Luft abfallenden Anteile des Paclitaxels (siehe Tabelle 6).

Unter der vereinfachenden Annahme, dass expandierte Ballonkatheter die Form eines geraden Kreiszyinders besitzen, ergibt sich für Katheter des Typs Orbus IV (2,25 mm x 17 mm) ein Oberflächeninhalt von 128 mm<sup>2</sup>.

Tabelle 6: Versuch d) – Auswirkungen der Wirkstoffkonzentration der Beschichtungslösung auf die Beschichtung

Ballonnummer	Art der Probe (Säule)	Paclitaxelkonzentration der Beschichtungslösung (mg/mL)	Beschichtungsdauer	Peakfläche Paclitaxel RT = 7,9 min	Paclitaxelkonzentration in der Probe (µg/mL)	Paclitaxelmenge in der Probe (µg)	Paclitaxelmenge (mit abgefallenem Wirkstoff/ Plastikschutzhülle/ Faltwerkzeug) pro mm <sup>2</sup> Ballonoberfläche (µg)
	Standard (20 µg/mL) in Ethanol						
	Säule 1*			795.468	20,0		
	Säule 2*			804.873	20,0		
1	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1)	20	10 min	2.584.391 96.178 8.215	65,0 2,4 0,2	97,5 3,6 0,3	0,79
2	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1)	20	10 min	2.694.569 26.212 0	67,7 0,7 0,0	101,6 1,0 0,0	0,80
3	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	50	10 min	5.858.799 808.752 7.685	147,3 20,1 0,2	221,0 30,1 0,3	1,96
4	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (2)	50	10 min	8.792.253 305.632 78.815	221,1 7,7 2,0	331,6 11,5 2,9	2,70
5	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	100	10 min	8.341.820 3.167.190 104.159	209,7 78,7 2,6	314,6 118,1 3,9	3,41
6	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	100	10 min	12.794.372 3.997.741 56.730	321,7 99,3 1,4	482,5 149,0 2,1	4,95
7	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	20	1 min plus 3 x 5 s	2.659.540 563.137 23.543	66,9 14,0 0,6	100,3 21,0 0,9	0,95
8	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1)	20	1 min plus 3 x 5 s	3.868.302 29.306 6.726	97,3 0,7 0,2	145,9 1,1 0,3	1,15
9	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	50	1 min plus 3 x 5 s	19.985.702 2.779.048 42.317	502,5 69,1 1,1	753,7 103,6 1,6	6,71
10	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1)	50	1 min plus 3 x 5 s	8.828.140 2.319.536 166.640	222,0 57,6 4,2	332,9 86,5 6,3	3,33
11	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	100	1 min plus 3 x 5 s	11.748.016 2.952.702 270.186	295,4 73,4 6,7	443,1 110,1 10,1	4,40
12	gefaltet beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2)	100	1 min plus 3 x 5 s	12.146.368 3.292.727 233.901	305,4 81,8 5,8	458,1 122,7 8,7	4,61

Ballon- nummer	Art der Probe  (Säule)	Paclitaxel- konzentration der Beschichtungs- lösung (mg/mL)	Beschichtungs- dauer	Peakfläche Paclitaxel  RT = 7,9 min	Paclitaxel- konzentration in der Probe  (µg/mL)	Paclitaxelmenge in der Probe  (µg)	Paclitaxelmenge (mit abgefallenem Wirkstoff/ Plastikschutzhülle/ Faltwerkzeug) pro mm <sup>2</sup> Ballonoberfläche (µg)
13	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (2)	20	1 min plus 3 x 5 s	685.909 79.909 0 24.906	17,2 2,0 0,0 0,6	25,9 3,0 0,0 0,9	0,23
14	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (2)	20	1 min plus 3 x 5 s	370.492 0 14.436 28.155	9,3 0,0 0,4 0,7	14,0 0,0 0,5 1,0	0,12
15	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (1)	50	1 min plus 3 x 5 s	1.398.558 10.717 27.988 86.746	35,2 0,3 0,7 2,2	52,7 0,4 1,1 3,3	0,45
16	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (2)	50	1 min plus 3 x 5 s	1.192.330 11.670 0 126.738	30,0 0,3 0,0 3,1	45,0 0,4 0,0 4,7	0,39
17	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (2) Plastikschutzhülle (2) Faltwerkzeug (2)	100	1 min plus 3 x 5 s	2.636.337 192.872 0 52.006	66,3 4,8 0,0 1,3	99,4 7,2 0,0 1,9	0,85
18	expandiert beschichteter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (2)	100	1 min plus 3 x 5 s	5.020.578 44.375 48.556 299.734	126,2 1,1 1,2 7,4	189,3 1,7 1,8 11,2	1,59
19	expandierter Ballon (1) abgefallener Wirkstoff (1) Plastikschutzhülle (1) Faltwerkzeug (1)	unbeschichtet	unbeschichtet	0 0 0 0	0,0 0,0 0,0 0,0	0,0 0,0 0,0 0,0	0,00

\*Die Messungen erfolgten auf 2 HPLC-Anlagen.

Abbildung 13: Abhängigkeit der aufgetragenen Wirkstoffmenge von der Konzentration der Beschichtungslösung

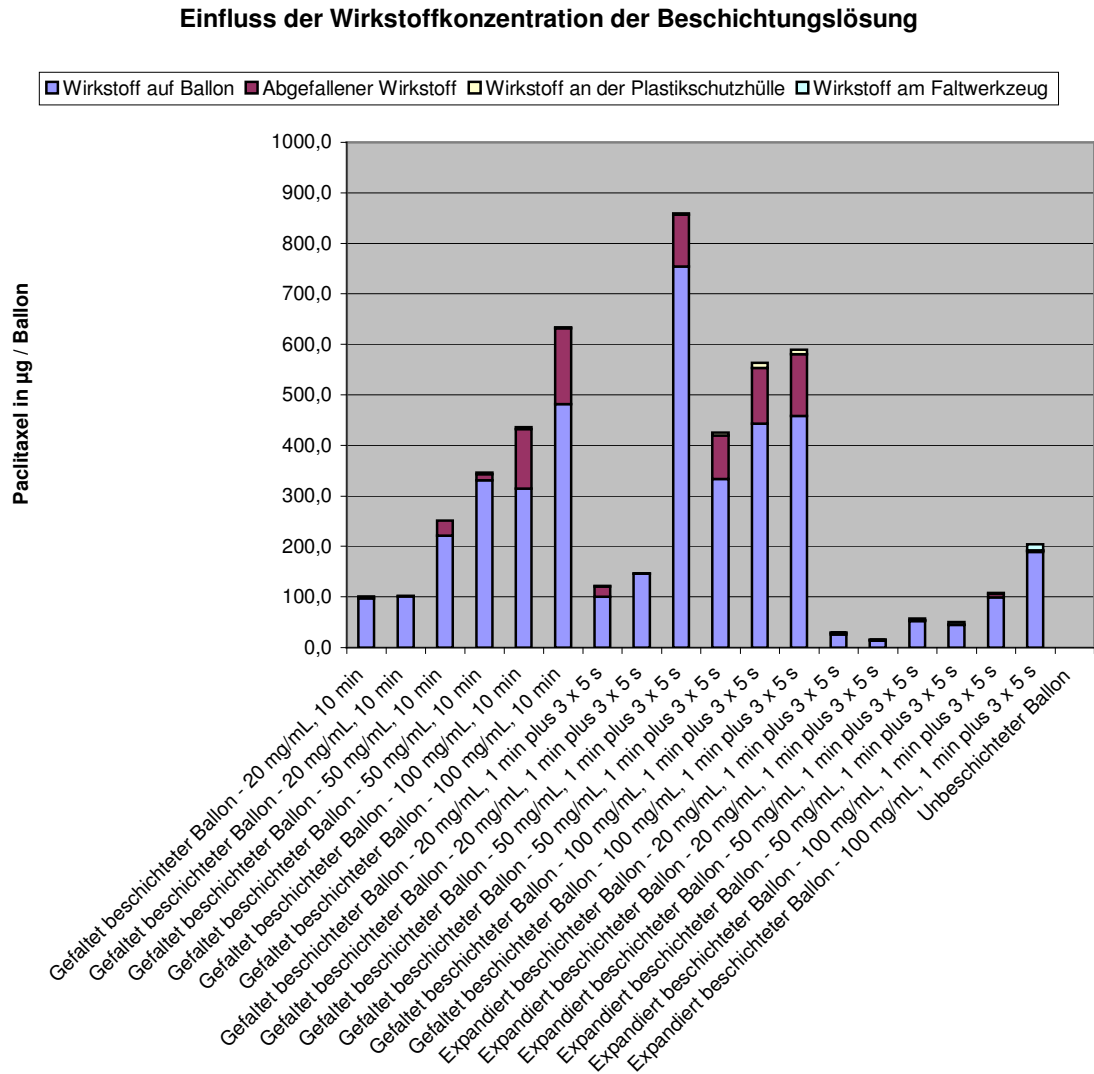
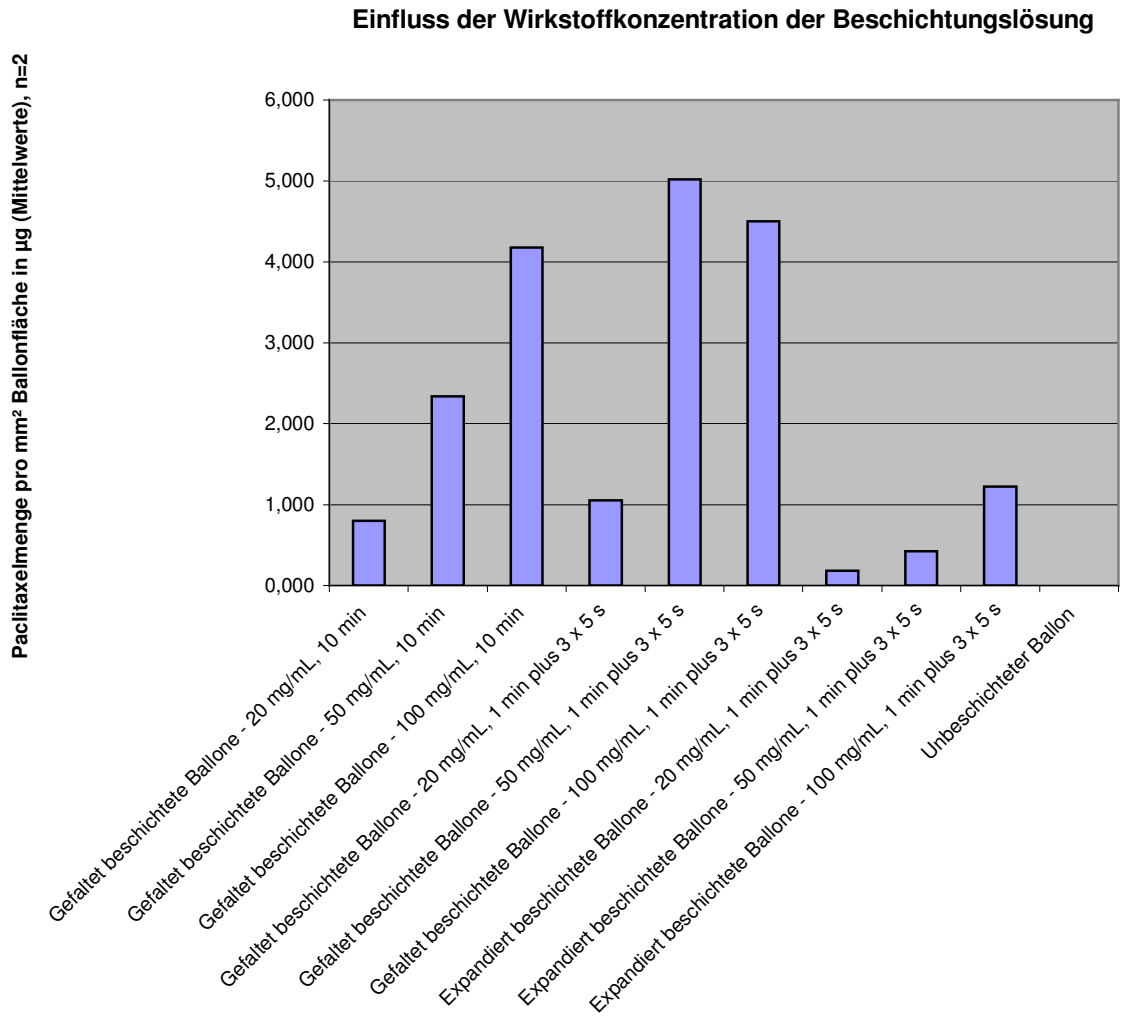




Abbildung 14: Abhängigkeit der pro mm<sup>2</sup> Ballonoberfläche aufgetragenen Wirkstoffmenge von der Konzentration der Beschichtungslösung



Durch die Erhöhung der Paclitaxelkonzentration in der Beschichtungslösung ließen sich deutlich größere Wirkstoffmengen auf die Ballone auftragen (siehe Abbildungen 13 und 14). Dies gilt sowohl für gefaltet wie auch für expandiert beschichtete Ballone. Lediglich bei den nach Standardmethode gefaltet beschichteten Ballonkathetern ließ sich durch Verwendung der 100 mg/mL konzentrierten Beschichtungslösung kein Vorteil gegenüber der 50 mg/mL Konzentration mehr zeigen. Das könnte daran liegen, dass auch bei dieser Konzentration die Aufnahmekapazität der Ballone mit über 4 µg Wirkstoff pro mm<sup>2</sup> Ballonoberfläche bereits nahezu erreicht ist (siehe Abbildung 14). Auf den expandiert getauchten Ballonen ließen sich Beschichtungen in dieser Größenordnung auch bei Verwendung der höchsten Wirkstoffkonzentration in der Beschichtungslösung nicht realisieren. Während des Expandierens der Ballone zeigte die Wirkstoffschicht auf den mit hochkonzentrierten Lösungen, gefaltet beschichteten Ballonen die größte Tendenz zum Abfallen (siehe Abbildung 13). Dieses Verhalten könnte sich in-vivo möglicherweise sogar als vorteilhaft erweisen, da der Wirkstoff dadurch leichter in die Arterienwand gedrückt werden kann.

#### **4.1.4. Verschiedene Ballonfaltungszustände**

Unter 3.1.1. Versuch e) wurden bereits die leicht veränderten Versuchsbedingungen beschrieben, die beim Vergleich der Beschichtbarkeit der unterschiedlich gefalteten Ballone zum Einsatz kamen. Verwendet wurde der Kathetertyp Orbus I - blau (3,5 mm x 20 mm) der Firma BMT im gefalteten, aufgefalteten sternförmigen und voll expandierten Zustand. Handelsüblich sind die Ballonkatheter im gefalteten Zustand (siehe Abbildung 17). Durch Füllen mit Luft oder Flüssigkeit konnten sie in einen expandierten Zustand gebracht werden (siehe Abbildung 15), während sie sich über Wasserdampf ohne Füllung des Balloninhaltes vorsichtig sternförmig auffalten ließen (siehe Abbildung 16). Dazu wurde Wasser zunächst bis zum Sieden erhitzt. Die gefalteten Ballone wurden dann für etwa eine Minute in den heißen Wasserdampf gehalten, bis sich die Falten sternförmig vom Katheterschaft abspreizten. Beim anschließenden Trocknen an der Luft blieb der aufgefalteten sternförmige Zustand erhalten und die Ballone konnten beschichtet werden.

Abbildung 15: Querschnitt durch einen Ballonkatheter in expandiertem Zustand (Skizze)

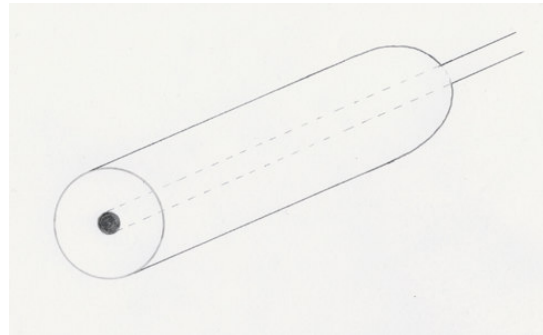


Abbildung 16: Querschnitt durch einen Ballonkatheter in aufgefaltet-sternförmigem Zustand (Skizze)

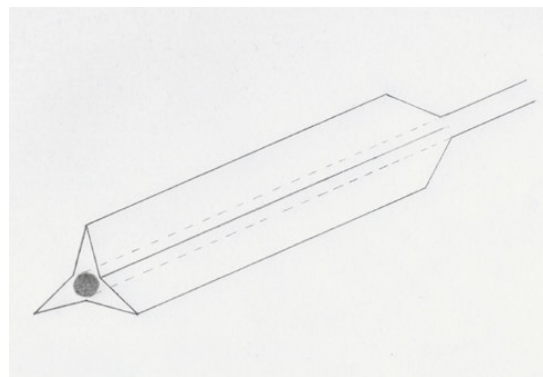
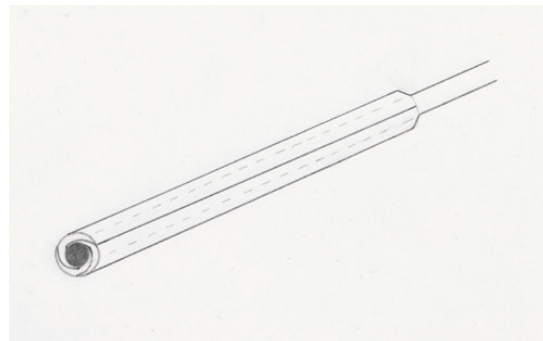


Abbildung 17: Querschnitt durch einen Ballonkatheter in gefaltetem Zustand (Skizze)



Zum Einsatz kam die Beschichtungslösung: 0,45 mL Ethanol + 100  $\mu$ L Ultravist<sup>®</sup> 370 + 4,5 mL Aceton + 150 mg Paclitaxel. Getaucht wurde ausschließlich nach der unter 3.1.1. beschriebenen Standardmethode mit 4-facher Wiederholung (siehe Tabelle 7). Unter der vereinfachenden Annahme, dass expandierte Ballonkatheter die Form eines geraden Kreiszylinders besitzen, ergibt sich für Katheter des Typs Orbus I - blau (3,5 mm x 20 mm) ein Oberflächeninhalt von 239 mm<sup>2</sup>.

Tabelle 7: Versuch e) – Auswirkungen unterschiedlicher Ballonfaltungszustände auf die Beschichtung

Ballonnummer	Art der Probe (Säule)	Beschichtungsdauer	Peakfläche Paclitaxel RT = 7,9 min	Konzentration Paclitaxel (µg/mL)	Paclitaxelmenge in der Probe (µg)	Paclitaxelmenge (mit abgefallenem Wirkstoff/ Plastikschutzhülle/ Faltwerkzeug pro mm <sup>2</sup> Ballonoberfläche (µg) (Mittelwerte ± Standardabweichung)
	Standard (20 µg/mL) in Ethanol					
	Säule 1*		777.499	20,0		
	Säule 2*		777.786	20,0		
1	gefaltet beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	14.407.310	370,6	481,8	<b>1,82 ± 0,12</b>
	abgefallener Wirkstoff (1)		39.939	1,0	1,3	
	Plastikschutzhülle (1)		95.651	2,5	3,2	
2	gefaltet beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	13.275.794	341,5	443,9	
	abgefallener Wirkstoff (2)		66.322	1,7	2,2	
	Plastikschutzhülle (2)		136.384	3,5	4,6	
3	gefaltet beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	12.003.493	308,8	401,4	
	abgefallener Wirkstoff (2)		204.892	5,3	6,8	
	Plastikschutzhülle (2)		202.127	5,2	6,8	
4	gefaltet beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	12.108.176	311,5	404,9	
	abgefallener Wirkstoff (1)		293.920	7,6	9,8	
	Plastikschutzhülle (2)		208.828	5,4	7,0	
5	gefaltet beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	11.885.378	305,7	397,5	
	abgefallener Wirkstoff (2)		112.123	2,9	3,7	
	Plastikschutzhülle (2)		145.405	3,7	4,9	
6	aufgefaltet-sternförmig beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	10.928.304	281,1	365,4	<b>1,21 ± 0,24</b>
	abgefallener Wirkstoff (2)		142.162	3,7	4,8	
	Plastikschutzhülle (2)		85.027	2,2	2,8	
	Faltwerkzeug (2)		8.991	0,2	0,3	
7	aufgefaltet-sternförmig beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	7.355.391	189,2	246,0	
	abgefallener Wirkstoff (2)		6.583	0,2	0,2	
	Plastikschutzhülle (1)		25.264	0,6	0,8	
	Faltwerkzeug (1)		19.966	0,5	0,7	
8	aufgefaltet-sternförmig beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	9.687.430	249,2	324,0	
	abgefallener Wirkstoff (2)		163.842	4,2	5,5	
	Plastikschutzhülle (2)		91.146	2,3	3,0	
	Faltwerkzeug (2)		63.738	1,6	2,1	
9	aufgefaltet-sternförmig beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	6.421.474	165,2	214,7	
	abgefallener Wirkstoff (1)		26.128	0,7	0,9	
	Plastikschutzhülle (1)		9.437	0,2	0,3	
	Faltwerkzeug (2)		18.670	0,5	0,6	
10	aufgefaltet-sternförmig beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	7.929.270	204,0	265,2	
	abgefallener Wirkstoff (2)		12.737	0,3	0,4	
	Plastikschutzhülle (2)		57.564	1,5	1,9	
	Faltwerkzeug (2)		21.727	0,6	0,7	

Ballon- nummer	Art der Probe (Säule)	Beschichtungs- dauer	Peakfläche Paclitaxel RT = 7,9 min	Konzentration Paclitaxel (µg/mL)	Paclitaxelmenge in der Probe (µg)	Paclitaxelmenge (mit abgefallenem Wirkstoff/ Plastikschutzhülle/ Faltwerkzeug) pro mm <sup>2</sup> Ballonoberfläche (µg) (Mittelwerte ± Standardabweichung)
11	expandiert beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	1.270.635	32,7	42,5	<b>0,17 ± 0,03</b>
	abgefallener Wirkstoff (1)		0	0,0	0,0	
	Plastikschutzhülle (1)		11.430	0,3	0,4	
	Faltwerkzeug (1)		53.307	1,4	1,8	
12	expandiert beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	1.026.031	26,4	34,3	
	abgefallener Wirkstoff (2)		0	0,0	0,0	
	Plastikschutzhülle (2)		0	0,0	0,0	
	Faltwerkzeug (2)		17.798	0,5	0,6	
13	expandiert beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	874.994	22,5	29,3	
	abgefallener Wirkstoff (2)		0	0,0	0,0	
	Plastikschutzhülle (1)		0	0,0	0,0	
	Faltwerkzeug (1)		7.831	0,2	0,3	
14	expandiert beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	1.450.496	37,3	48,5	
	abgefallener Wirkstoff (2)		0	0,0	0,0	
	Plastikschutzhülle (2)		0	0,0	0,0	
	Faltwerkzeug (2)		73.327	1,9	2,5	
15	expandiert beschichteter Ballon (1)	1 min plus 3 x 5 s	1.177.161	30,3	39,4	
	abgefallener Wirkstoff (1)		0	0,0	0,0	
	Plastikschutzhülle (2)		0	0,0	0,0	
	Faltwerkzeug (1)		28.299	0,7	0,9	
16	expandierter Ballon (1)	unbeschichtet	0	0,0	0,0	<b>0,00</b>
	abgefallener Wirkstoff (2)		0	0,0	0,0	
	Plastikschutzhülle (2)		0	0,0	0,0	
	Faltwerkzeug (2)		0	0,0	0,0	

\*Die Messungen erfolgten auf 2 HPLC-Anlagen.

Abbildung 18: Abhängigkeit der aufgetragenen Wirkstoffmenge vom Ballonfaltungszustand

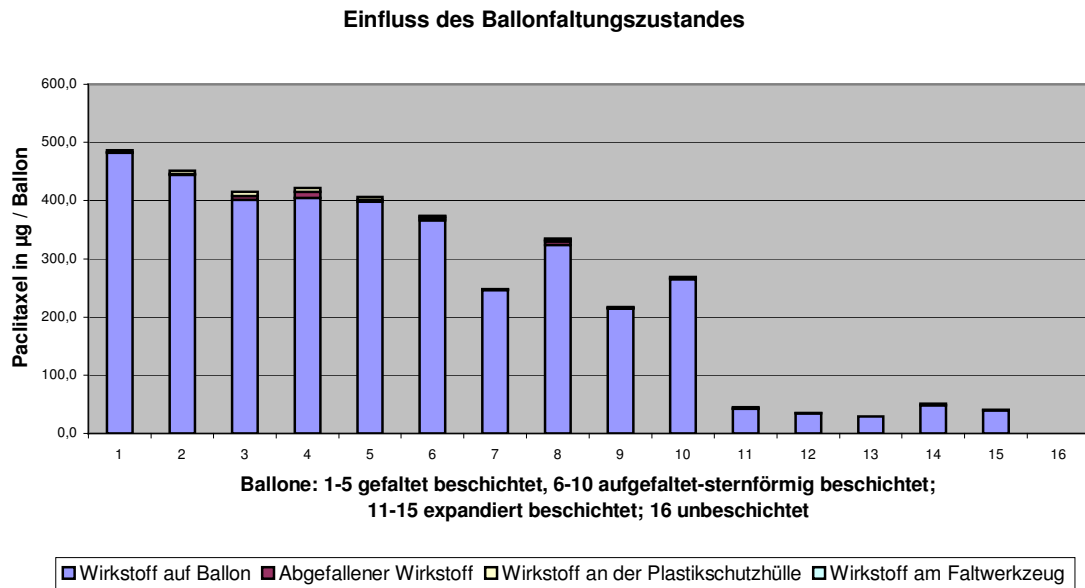
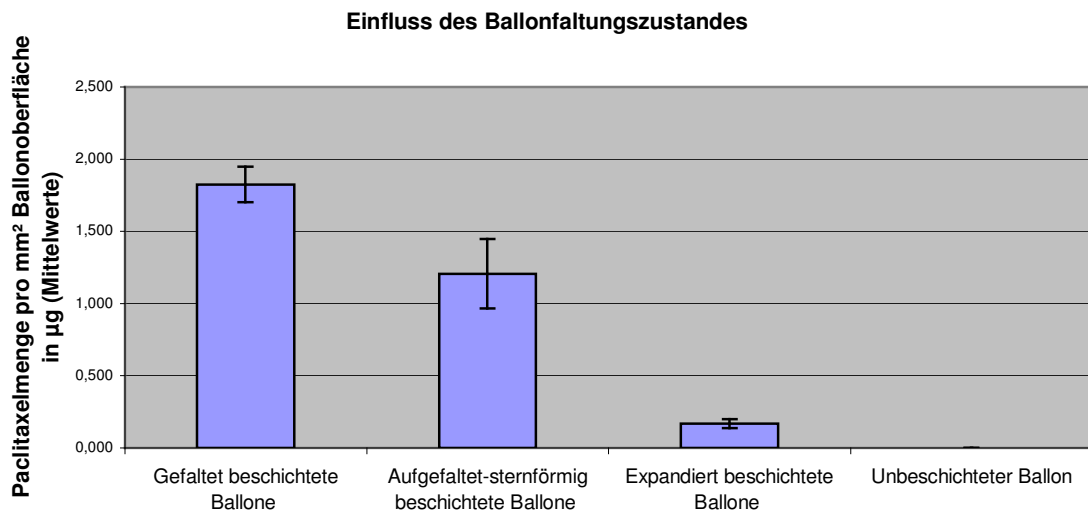


Abbildung 19: Abhängigkeit der pro mm<sup>2</sup> Ballonoberfläche aufgetragenen Wirkstoffmenge vom Ballonfaltungszustand, Arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 5



Da alle Ballone nach dem gleichen Tauchverfahren beschichtet wurden, lassen sich eindeutige Aussagen zum Einfluss des Ballonfaltungszustandes auf die aufbringbare Wirkstoffmenge treffen. Wie nach den vorangegangenen Versuchen erwartet werden konnte, ließ sich auf die gefaltet getauchten Ballone eine wesentlich größere Paclitaxelmenge auftragen als auf die expandiert beschichteten Ballone. Es zeigte sich, dass die aufgefaltet-sternförmig getauchten Ballone hinsichtlich der aufgetragenen Wirkstoffmenge eine Zwischenposition zwischen den beiden anderen Faltungszuständen einnahmen (siehe Abbildungen 18 und 19). Der Wirkstoffverlust durch Haften an Plastikschrühülle oder Faltwerkzeug bzw. Abfallen während des Expandierens der blieb bei allen beschichteten Ballonen relativ gering (siehe Abbildung 18).

Durch Zusatz von Sudanrot zur Tauchlösung wurde die Beschichtung der Ballone optisch sichtbar gemacht, um die Gleichmäßigkeit begutachten zu können. Vollkommen gleichmäßig gelang die Beschichtung in keinem der untersuchten Faltungszustände, dennoch wurden deutliche Unterschiede sichtbar. Während bei den expandiert beschichteten Ballonen das Sudanrot relativ gleichmäßig auf der Ballonoberfläche verteilt war, entstanden bei Einsatz der anderen Faltungszustände deutliche Längsstreifen verstärkter Färbung. Diese Beobachtung stützt die Theorie, dass die Beschichtungslösung beim Tauchen in die Falten eindringt und die gelöste Substanz sich dort beim Trocknen verstärkt ablagert.

#### **4.1.5. Indocyaningrün zur Vorabkontrolle der Beschichtung**

Die Beschichtung der Ballonkatheter mit dem Farbstoff Indocyaningrün erfolgte nicht im Tauchverfahren, sondern (wie unter 3.1.3. beschrieben) durch Auftropfen eines festgelegten Volumens der Farbstofflösung bekannter Konzentration mittels Kanüle. Dadurch sollte nach der folgenden fluorimetrischen Bestimmung des Indocyaningrüns überprüft werden können, ob die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten der Menge des aufgetragenen Farbstoffes entsprechen. In diesem Fall wäre das fluorimetrische Verfahren zur zukünftigen Vorabkontrolle des Beschichtungserfolges im Tauchverfahren einsetzbar, wenn man der Tauchlösung den Farbstoff Indocyaningrün in bekannter, geringer Konzentration zusetzen würde.

Verwendet wurden Ballonkatheter vom Typ Orbus IV (2,25 mm x 17 mm), die nach der Beschichtung mit Indocyaningrün mittels Fluoreszenz-Spektroskopie gefaltet (mit und ohne Schutzhülle) sowie expandiert vermessen wurden (siehe Tabelle 8).

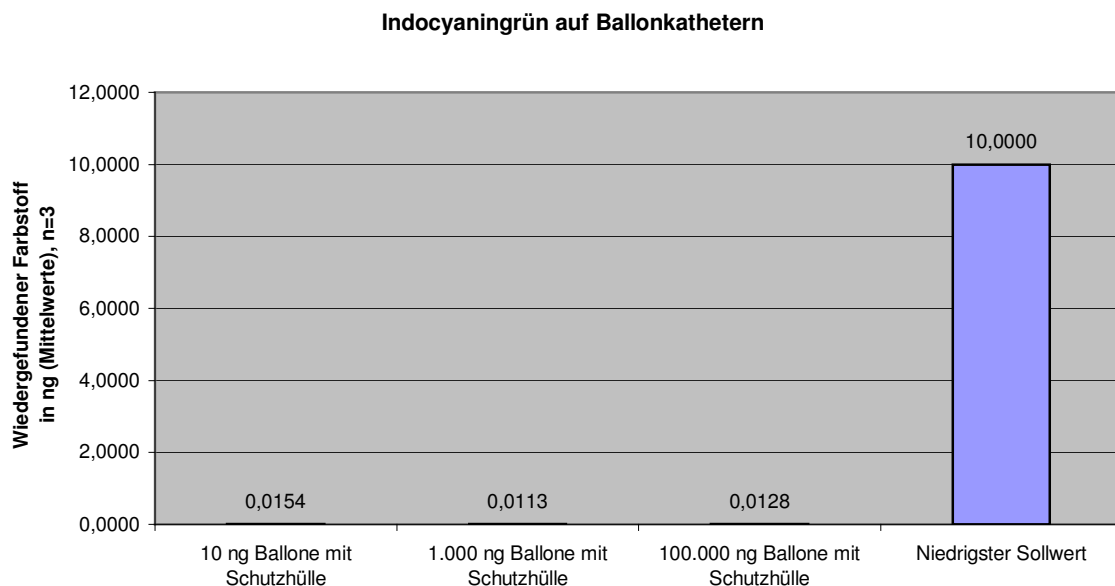
Tabelle 8: Versuch f) – Ballonbeschichtung mit Indocyaningrün –  
10, 1.000 bzw. 100.000 ng pro Ballon

Nummer des Katheters	Intensitätsmaximum	Vermessung des Katheters	Blende	Summe der Intensitäten	Masse in ng (wiedergefunden)	Masse in ng Mittelwerte ± Standardabweichung	Sollwert in ng (aufgetragen)
1	57.442	mit Schutzhülle	2,8	372.569.582	0,0107		10
2	96.677	mit Schutzhülle	2,8	558.311.031	0,0161	0,0153 ± 0,0035	10
3	131.737	mit Schutzhülle	2,8	666.591.197	0,0192		10
1	53.974	ohne Schutzhülle	2,8	350.080.927	0,0101		10
2	85.243	ohne Schutzhülle	2,8	492.284.096	0,0142	0,0133 ± 0,0023	10
3	106.071	ohne Schutzhülle	2,8	536.722.034	0,0155		10
1	21.768	expandiert	2,8	261.151.702	0,0075		10
2	27.486	expandiert	2,8	343.915.452	0,0099	0,0113 ± 0,0039	10
3	52.837	expandiert	2,8	574.873.662	0,0166		10
4	65.635	mit Schutzhülle	2,8	450.518.691	0,0130		0,0113 ± 0,0016
5	57.713	mit Schutzhülle	2,8	408.321.784	0,0118	1.000	
6	39.714	mit Schutzhülle	2,8	316.919.158	0,0091	1.000	
4	51.657	ohne Schutzhülle	2,8	354.576.539	0,0102	0,0084 ± 0,0015	1.000
5	44.906	ohne Schutzhülle	2,8	294.365.320	0,0085		1.000
6	28.864	ohne Schutzhülle	2,8	230.338.581	0,0066		1.000
4	32.855	expandiert	2,8	373.239.236	0,0108	0,0115 ± 0,0023	1.000
5	25.615	expandiert	2,8	313.917.009	0,0091		1.000
6	41.064	expandiert	2,8	501.474.136	0,0145		1.000
7	45.662	mit Schutzhülle	2,8	338.356.134	0,0098	0,0128 ± 0,0024	100.000
8	89.470	mit Schutzhülle	2,8	545.325.428	0,0157		100.000
9	65.029	mit Schutzhülle	2,8	446.364.223	0,0129		100.000
7	46.704	ohne Schutzhülle	2,8	280.504.502	0,0081	0,0113 ± 0,0025	100.000
8	86.175	ohne Schutzhülle	2,8	491.025.165	0,0142		100.000
9	58.523	ohne Schutzhülle	2,8	401.707.334	0,0116		100.000
7	32.719	expandiert	2,8	318.162.983	0,0092	0,0131 ± 0,0032	100.000
8	53.180	expandiert	2,8	452.775.469	0,0131		100.000
9	69.275	expandiert	2,8	592.302.736	0,0171		100.000
7	2.313	nur die Schutzhülle	2,8	18.393.793	0,0005		
	189.719	Standard (5 ng/mL)	8	2.337.535.789			0,5
	360.361	Standard (5 ng/mL)	5,6	4.440.016.620			0,5
	703.261	Standard (5 ng/mL)	4	8.664.889.584			0,5
	687.003	Standard (500 ng/mL)	8	8.464.566.126			50
	703.288	Standard (500 ng/mL)	8	8.665.215.047			50



Die Berechnung der Indocyaningrün-Menge auf den Kathetern erfolgte mit Hilfe der Standards aus den gemessenen Intensitäten. Dazu wurden die Standardlösungen in eine Küvette mit innerer Breite von 1 cm und innerer Höhe von 1 mm gefüllt. Zur Auswertung wurde ein Küvettenabschnitt von 1 cm Länge herangezogen. Es wurde somit die Fluoreszenzintensität von 100 µL der jeweiligen Farbstofflösung erfasst. Der Vergleich der gemessenen Intensitäten der Standards zeigte, dass der 100-fach höher konzentrierte Standard (500 ng/mL) nur eine knapp 4-fach größere Intensität zeigte als der niedriger konzentrierte Standard (5 ng/mL). Es wurde angenommen, dass es infolge der hohen Konzentration zum Quenching kam, weshalb zur Berechnung der Indocyaninmenge auf den Kathetern der niedriger konzentrierte Standard herangezogen wurde. Dessen gemessene Intensität betrug bei Verwendung von Blende 4  $8,7 \cdot 10^9$  Einheiten, was umgerechnet auf Blende 2,8 einer Intensität von  $17,3 \cdot 10^9$  Einheiten entspricht. Damit konnte nun aus den Intensitätswerten der Indocyaningrün-Ballone auf die aufgetragene Farbstoffmenge geschlossen werden (siehe Tabelle 8).

Abbildung 20: Wiederfindung des aufgetragenen Farbstoffes mittels Fluorimetrie – 10, 1.000 bzw. 100.000 ng Indocyaningrün pro Ballon



Das Indocyaningrün ließ sich auf den Ballonkathetern gut sichtbar machen, wodurch erwartungsgemäß auch die ungleichmäßige Beschichtung zum Vorschein kam. Allerdings gab die gemessene Intensität bei weitem nicht die aufgetragene Farbstoffmenge wieder (siehe Abbildung 20). Wahrscheinlich waren die aufgetragenen Farbstoffmengen zu groß, weshalb es zu Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und in deren Folge zum Quenching gekommen sein wird.

Deshalb wurde ein weiterer Beschichtungsversuch mit niedriger konzentrierten Indocyaningrün-Lösungen durchgeführt (siehe Tabelle 9). Von diesen wurden festgelegte Volumina mittels Kanüle nach und nach auf die Ballone aufgetropft, so dass sich schließlich 0,01 ng, 0,1 ng beziehungsweise 1 ng des Farbstoffes auf den Ballonen befanden. Die Beschichtung mit dem Farbstoff und dessen fluorimetrische Bestimmung erfolgten erneut wie unter Punkt 3.1.3. beschrieben. Verwendet wurden diesmal allerdings Ballonkatheter der Größe 2,0 x 20 mm, die mittels Fluoreszenz-Spektroskopie gefaltet (mit und ohne Schutzhülle) sowie expandiert vermessen wurden (siehe Tabelle 9). Um noch genauere Ergebnisse zu erhalten und eine potentielle Fehlerquelle auszuschließen, erfolgten zusätzlich Bestimmung und Berücksichtigung der Hintergrundintensität.

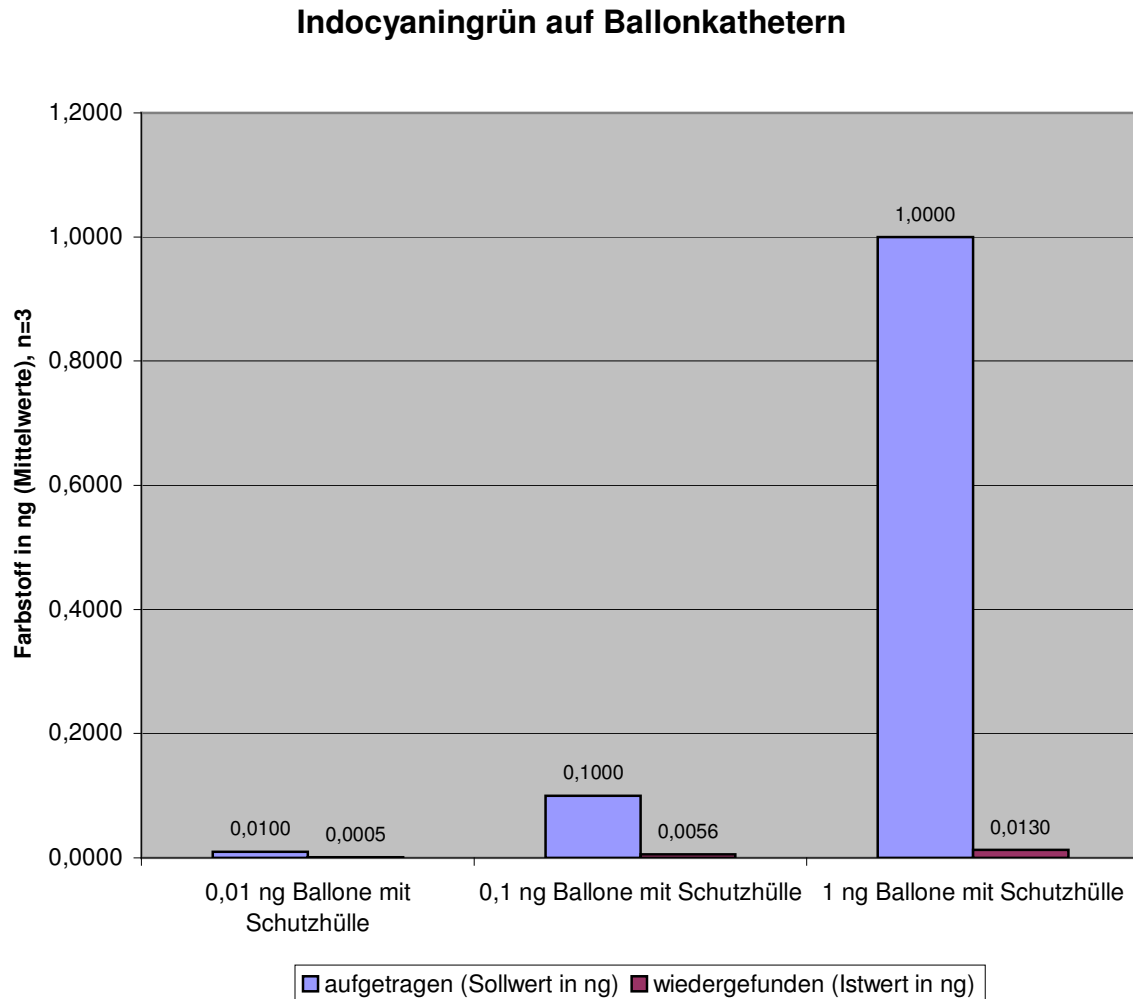
Die Berechnung der auf die Ballonkatheter aufgetragenen Indocyaningrün-Mengen erfolgte ebenso wie im ersten Versuch mit Hilfe von Standards. Es wurde in Küvetten wieder die Fluoreszenzintensität von 100 µL der Farbstofflösungen bestimmt. Erneut zeigte sich bereits bei den Standards, die den Farbstoff in einem Aceton-Ethanol-Gemisch (9:1) enthielten, dass das Verhältnis der gemessenen Intensitäten nicht dem des eingesetzten Farbstoffes entsprach. Der Vergleich der erfassten Intensitäten der Standards zeigte, dass der 100-fach höher konzentrierte Standard (5 ng/mL) nur zu einer etwa 3-fach größeren Intensität als der am niedrigsten konzentrierte Standard (0,05 ng/mL) führte. Zur Berechnung der Indocyaningrün-Menge auf den Ballonkathetern wurde die gemessene Intensität der am niedrigsten konzentrierten Standardlösung (0,05 ng/mL) verwendet. Die so berechneten Farbstoffmengen auf den Ballonen entsprachen zwar nicht den tatsächlich aufgetragenen, aber zwischen den gefaltet vermessenen Ballonen mit den geringsten aufgetragenen Indocyaningrün-Mengen (0,01 ng und 0,1 ng) verhielten sich auch die gemessenen Intensitäten wie 1:10 (siehe Abbildung 21). Auf die

expandiert vermessenen Ballone traf das nicht zu – es kann aber auch sein, dass beim Expandieren etwas Farbstoff abgefallen ist.

Tabelle 9: Versuch g) – Ballonbeschichtung mit Indocyaningrün –  
0,01, 0,1 bzw. 1 ng pro Ballon

Nummer des Katheters	Vermessung des Katheters	Blende	Summe der Intensitäten der Probe	Masse in ng (wiedergefunden)	Masse in ng Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung	Sollwert in ng (aufgetragen)
1	mit Schutzhülle	2,8	120.918.288	0,0079		1,00
2	mit Schutzhülle	2,8	231.023.424	0,0150	0,0130 $\pm$ 0,0037	1,00
3	mit Schutzhülle	2,8	249.277.192	0,0162		1,00
1	ohne Schutzhülle	2,8	76.434.656	0,0050		
2	ohne Schutzhülle	2,8	181.984.304	0,0118	0,0096 $\pm$ 0,0033	1,00
3	ohne Schutzhülle	2,8	185.255.480	0,0120		1,00
1	expandiert	2,8	79.753.344	0,0052		
2	expandiert	2,8	218.668.848	0,0142	0,0119 $\pm$ 0,0048	1,00
3	expandiert	2,8	252.034.112	0,0164		1,00
4	mit Schutzhülle	2,8	45.392.680	0,0029		
5	mit Schutzhülle	2,8	96.136.624	0,0062	0,0055 $\pm$ 0,0019	0,10
6	mit Schutzhülle	2,8	115.267.808	0,0075		0,10
4	ohne Schutzhülle	2,8	33.981.496	0,0022		
5	ohne Schutzhülle	2,8	83.598.040	0,0054	0,0046 $\pm$ 0,0017	0,10
6	ohne Schutzhülle	2,8	96.093.592	0,0062		0,10
4	expandiert	2,8	77.002.864	0,0050		
5	expandiert	2,8	109.770.528	0,0071	0,0062 $\pm$ 0,0009	0,10
6	expandiert	2,8	99.857.888	0,0065		0,10
7	mit Schutzhülle	2,8	7.131.832	0,0005		
8	mit Schutzhülle	2,8	8.956.664	0,0006	0,0005 $\pm$ 0,0001	0,01
9	mit Schutzhülle	2,8	6.374.464	0,0004		0,01
7	ohne Schutzhülle	2,8	5.309.816	0,0003		
8	ohne Schutzhülle	2,8	7.733.648	0,0005	0,0004 $\pm$ 0,0001	0,01
9	ohne Schutzhülle	2,8	5.074.128	0,0003		0,01
7	expandiert	2,8	15.848.224	0,0010		
8	expandiert	2,8	19.149.248	0,0012	0,0011 $\pm$ 0,0001	0,01
9	expandiert	2,8	16.443.520	0,0011		0,01
	Standard 5 ng/mL	2,8	242.526.576			
	Standard 0,5 ng/mL	2,8	222.475.440			0,050
	Standard 0,05 ng/mL	2,8	76.994.640			0,005

Abbildung 21: Wiederfindung des aufgetragenen Farbstoffes mittels Fluorimetrie –  
0,01, 0,1 bzw. 1 ng Indocyaningrün pro Ballon



Auch die in diesem Versuch aufgebrauchten, geringeren Indocyaningrün-Mengen waren noch detektierbar. Die Farbstoffverteilung auf den Ballonkathetern erwies sich erwartungsgemäß als etwas ungleichmäßig.

## 4.2. Paclitaxel in Röntgenkontrastmitteln

### 4.2.1. Löslichkeit von Paclitaxel in Abhängigkeit von der Iopromidkonzentration

Wie bereits im Abschnitt 3.2.3. ausführlich beschrieben, wurde die Abhängigkeit der Paclitaxellöslichkeit von der Iopromidkonzentration im Lösemittel untersucht, indem die Kontrastmittelzubereitungen zu vorgelegter Paclitaxel-Festschubstanz hinzugefügt wurden.

Die Proben wurden mehrfach geschüttelt und in das Ultraschallbad gestellt (siehe 3.2.3.), um bestmögliche Lösungsbedingungen zu gewährleisten und die Schwankungen der Löslichkeit innerhalb der Proben eines Lösemittels so gering wie möglich zu halten. Nach dem Abfiltrieren des ungelösten Wirkstoffes konnte die Bestimmung des gelösten Paclitaxels mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie erfolgen (siehe Tabelle 10).

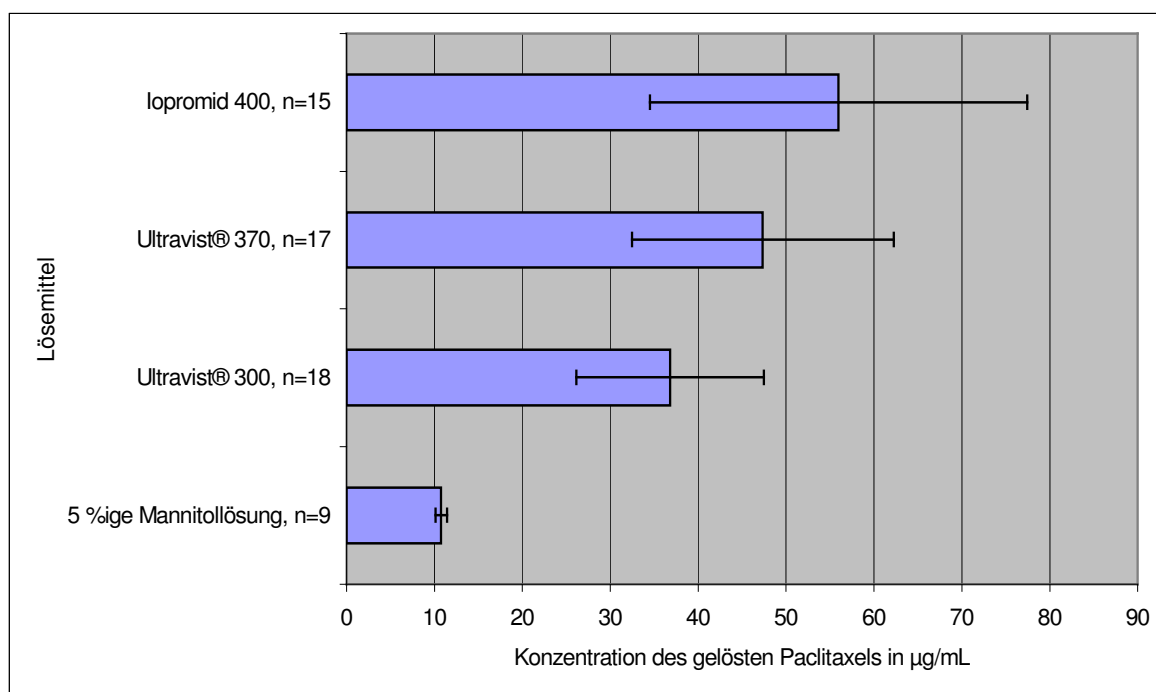
Tabelle 10: Abhängigkeit der Paclitaxellöslichkeit von der Iopromidkonzentration im Lösemittel

Probenbezeichnung	Lösemittel	Art der Probe	Peakfläche Paclitaxel RT= ca. 8,3 min	Konzentration Paclitaxel (gelöst) µg/mL	Mittelwert µg/mL	Standardabweichung µg/mL	Gelöstes Paclitaxel in % des zugesetzten Wirkstoffes (341,6 µg/mL)
Standard	Ethanol	Paclitaxelstandard	815.652	20,0			
1	Mannit 5%	nach Filtration	448.846	11,0	<b>10,8</b>	0,67	3,2
2	Mannit 5%	nach Filtration	429.184	10,5			3,1
3	Mannit 5%	nach Filtration	481.695	11,8			3,5
4	Mannit 5%	nach Filtration	405.553	9,9			2,9
5	Mannit 5%	nach Filtration	442.137	10,8			3,2
6	Mannit 5%	nach Filtration	393.692	9,7			2,8
7	Mannit 5%	nach Filtration	465.788	11,4			3,3
8	Mannit 5%	nach Filtration	438.286	10,7			3,1
9	Mannit 5%	nach Filtration	443.326	10,9			3,2

Probenbezeichnung	Lösemittel	Art der Probe	Peakfläche Paclitaxel RT= ca. 8,3 min	Konzentration Paclitaxel (gelöst) µg/mL	Mittelwert µg/mL	Standardabweichung µg/mL	Gelöstes Paclitaxel in % des zugesetzten Wirkstoffes (341,6 µg/mL)
10	Ultravist® 300	nach Filtration	132.208	32,4	<b>36,8</b>	10,69	9,5
11	Ultravist® 300	nach Filtration	88.610	21,7			6,4
12	Ultravist® 300	nach Filtration	138.946	34,1			10,0
13	Ultravist® 300	nach Filtration	176.848	43,4			12,7
14	Ultravist® 300	nach Filtration	110.184	27,0			7,9
15	Ultravist® 300	nach Filtration	107.701	26,4			7,7
16	Ultravist® 300	nach Filtration	137.159	33,6			9,8
17	Ultravist® 300	nach Filtration	76.710	18,8			5,5
18	Ultravist® 300	nach Filtration	117.549	28,8			8,4
19	Ultravist® 300	nach Filtration	215.727	52,9			15,5
20	Ultravist® 300	nach Filtration	172.167	42,2			12,4
21	Ultravist® 300	nach Filtration	196.320	48,1			14,1
22	Ultravist® 300	nach Filtration	224.321	55,0			16,1
23	Ultravist® 300	nach Filtration	204.354	50,1			14,7
24	Ultravist® 300	nach Filtration	167.144	41,0			12,0
25	Ultravist® 300	nach Filtration	176.954	43,4			12,7
26	Ultravist® 300	nach Filtration	123.239	30,2			8,8
27	Ultravist® 300	nach Filtration	134.679	33,0	9,7		
28	Ultravist® 370	nach Filtration	155.922	38,2	<b>47,3</b>	14,89	11,2
29	Ultravist® 370	nach Filtration	207.415	50,9			14,9
30	Ultravist® 370	nach Filtration	151.394	37,1			10,9
31	Ultravist® 370	nach Filtration	135.824	33,3			9,7
32	Ultravist® 370	nach Filtration	148.855	36,5			10,7
33	Ultravist® 370	nach Filtration	202.488	49,7			14,5
34	Ultravist® 370	nach Filtration	276.348	67,8			19,8
35	Ultravist® 370	nach Filtration	128.351	31,5			9,2
36	Ultravist® 370	nach Filtration	198.355	48,6			14,2
37	Ultravist® 370	nach Filtration	372.423	91,3			26,7
38	Ultravist® 370	nach Filtration	121.246	29,7			8,7
39	Ultravist® 370	nach Filtration	181.646	44,5			13,0
40	Ultravist® 370	nach Filtration	205.104	50,3			14,7
41	Ultravist® 370	nach Filtration	181.030	44,4			13,0
42	Ultravist® 370	nach Filtration	186.765	45,8			13,4
43	Ultravist® 370	nach Filtration	199.494	48,9			14,3
44	Ultravist® 370	nach Filtration	229.865	56,4			16,5
45	lopomid 400	nach Filtration	200.000	49,0	<b>56,0</b>	21,48	14,4
46	lopomid 400	nach Filtration	173.139	42,5			12,4
47	lopomid 400	nach Filtration	262.833	64,4			18,9
48	lopomid 400	nach Filtration	193.140	47,4			13,9
49	lopomid 400	nach Filtration	233.454	57,2			16,8
50	lopomid 400	nach Filtration	162.770	39,9			11,7
51	lopomid 400	nach Filtration	353.060	86,6			25,3
52	lopomid 400	nach Filtration	148.283	36,4			10,6
53	lopomid 400	nach Filtration	302.959	74,3			21,7
54	lopomid 400	nach Filtration	467.821	114,7			33,6
55	lopomid 400	nach Filtration	210.451	51,6			15,1
56	lopomid 400	nach Filtration	205.437	50,4			14,7
57	lopomid 400	nach Filtration	166.685	40,9			12,0
58	lopomid 400	nach Filtration	193.078	47,3			13,9
59	lopomid 400	nach Filtration	150.473	36,9			10,8

Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von Iopromid im Lösemittel einen deutlich positiven Einfluss auf die Löslichkeit des Wirkstoffes Paclitaxel hat. So ließ sich in handelsüblichem Ultravist® 300 etwa die 3,5-fache Menge des Wirkstoffes lösen – verglichen mit 5%iger Mannitollösung. Mit zunehmender Iopromidkonzentration wird dieser Effekt noch verstärkt. Die höchsten Wirkstoffkonzentrationen (über 50 µg/mL) ließen sich in selbst hergestellten Iopromid 400 - Zubereitungen (Herstellung wie unter 3.2.1. beschrieben) realisieren (siehe Abbildung 22).

Abbildung 22: Abhängigkeit der Paclitaxellöslichkeit von der Iopromidkonzentration



#### 4.2.2. Übersättigte Zubereitungen

Um therapeutische Konzentrationen zu erreichen, wurden (wie unter 3.2.4. beschrieben) höherkonzentrierte Paclitaxellösungen in Ultravist® hergestellt, indem der Wirkstoff bereits in Ethanol gelöst zugesetzt wurde. Bezogen auf das Volumen der endgültigen Zubereitung war der Ethanolgehalt kleiner oder gleich 1%. Diese Lösungen waren übersättigt, aber für einen bestimmten Zeitraum physikalisch stabil.

Auch bei dieser Verfahrensweise nahmen die Ultravist<sup>®</sup>-Zubereitungen im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung erheblich mehr Paclitaxel ohne Niederschlagsbildung auf. Beim Versuch eine 100 µmolare (85,4 µg/mL) Paclitaxellösung in 0,9%iger NaCl-Lösung herzustellen, kam es sofort zur Bildung eines flockigen Paclitaxelniederschlags. Es war dagegen problemlos möglich, sogar 200 µmolare (170,8 µg/mL) Paclitaxellösungen im Kontrastmittel Ultravist<sup>®</sup> 370 herzustellen (siehe Abbildung 23), ein interessantes Phänomen, das bei der lokalen Applikation von Paclitaxel zukünftig hilfreich sein kann.

Diese 200 µmolaren (170,8 µg/mL), übersättigten Lösungen in Ultravist<sup>®</sup> 370 sind einige Tage physikalisch stabil, es kommt also erst nach einiger Zeit zur Ausfällung des Wirkstoffes.

Paclitaxel	Paclitaxel	Paclitaxel
100 µM in 0.9% NaCl-Lösung	100 µM in Ultravist <sup>®</sup> 370	200 µM in Ultravist <sup>®</sup> 370
+1% V/V Ethanol	+1% V/V Ethanol	+1% V/V Ethanol

Abbildung 23:

Übersättigung mit  
Paclitaxel



Zum Vergleich wurde versucht Paclitaxel auch in MRT-Kontrastmitteln zu lösen, die Gadoliniumchelate enthalten. In Gadovist<sup>®</sup> gelang zwar auch die Herstellung einer 200 µmolaren (170,8 µg/mL) Lösung, allerdings bildete sich bereits nach wenigen Stunden der flockige Paclitaxelniederschlag. In Magnevist<sup>®</sup> ließ sich erst gar keine 200 µmolare (170,8 µg/mL) Zubereitung anfertigen.

Auf den Einsatz von Lösungsvermittlern wurde jeweils verzichtet, um im Hinblick auf eine spätere Anwendung am Herzen die Verträglichkeit bestmöglich zu erhalten.



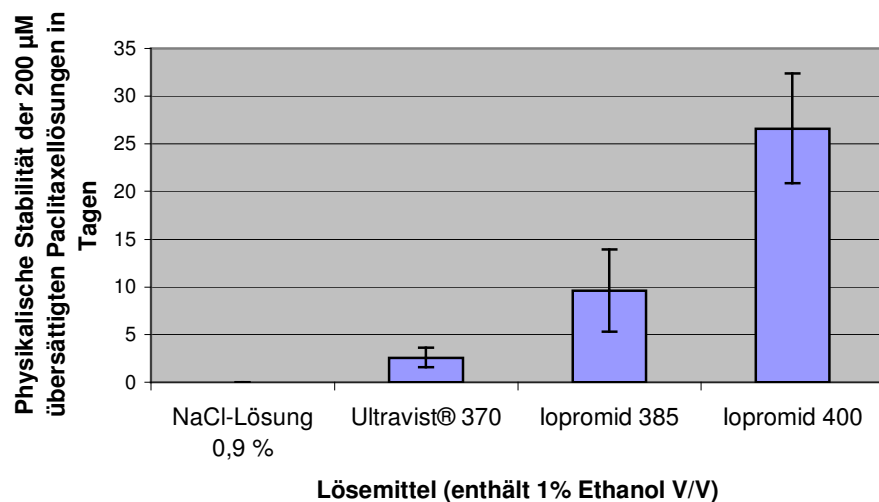
#### 4.2.2.1. Physikalische Stabilität in Abhängigkeit von der Iopromidkonzentration

Im anschließenden Experiment wurden (wie ebenfalls unter 3.2.4. beschrieben) die physikalischen Stabilitäten 200  $\mu\text{molarer}$  (170,8  $\mu\text{g/mL}$ ) übersättigter Paclitaxellösungen in Abhängigkeit von der Iopromidkonzentration im Lösemittel untersucht. Neben Ultravist<sup>®</sup> 370 kamen auch frisch hergestellte Iopromid 385 - und Iopromid 400 - Zubereitungen (Herstellung s. 3.2.1.) und zum Vergleich physiologische Kochsalzlösung als Lösemittel zum Einsatz.

Als Ergebnis zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der physikalischen Stabilität der Paclitaxelzubereitung von der Iopromidkonzentration im Lösemittel (siehe Abbildung 24). Vergingen während der Lagerung bei Raumtemperatur in Ultravist<sup>®</sup> 370 nur einige Tage (<5) bis zur Niederschlagsbildung, so waren es bei Iopromid 385 etwa 10 und bei Iopromid 400 mehr als 25 Tage.

Abbildung 24:

Abhängigkeit  
der phys. Stabilität  
von der Iopromid-  
konzentration,  
Arithmetische  
Mittelwerte  $\pm$   
Standard-  
abweichung  
n = 5



Da Iopromid 400 deutlich visköser als physiologische Kochsalzlösung ist und 1,05 molar eine sehr hydrophile neutrale Verbindung enthält, ging es in der Folge darum, zu untersuchen, ob die stabilisierende Wirkung der konzentrierten Ultravist<sup>®</sup>-Lösung auf deren erhöhte Viskosität oder die hohe Konzentration einer hydrophilen

Verbindung zurückzuführen ist, oder aber durch spezielle Eigenschaften des Iopromid-Moleküls bedingt wird. Zum Vergleich wurden eine zu Iopromid 400 gleichviskose Natriummethylcelluloselösung und eine zu Iopromid 400 gleichmolare Saccharoselösung hergestellt.

In beiden Vergleichslösungen bildete sich nach Zusatz einer ethanolischen Paclitaxellösung sofort ein flockiger Niederschlag, während die 200 µmolare (170,8 µg/mL) Paclitaxel-Zubereitung in Iopromid 400 eine klare, übersättigte Lösung ergab.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass es zwischen Paclitaxel- und Iopromid-Molekülen sehr wahrscheinlich zu Interaktionen kommt, welche die Löslichkeit von Paclitaxel entsprechend positiv beeinflussen.

#### **4.2.2.2. Teilchengrößen**

Das Auftreten von Wechselwirkungen zwischen Iopromid- und Paclitaxelmolekülen in wässriger Lösung könnte zur Bildung von Mizellen führen. Dies wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) untersucht (siehe 3.2.4.2.) .

Die Messungen mit PCS zeigten aber in je 3 unabhängig voneinander hergestellten Proben keine Zunahme der durchschnittlichen Teilchengröße bei Herstellung übersättigter 200 µmolarer (170,8 µg/mL) Paclitaxellösungen in Ultravist® 370 verglichen mit der Zugabe der entsprechenden Menge reinen Ethanol zu Ultravist® 370 (siehe Abbildungen 25 und 26).

Daraus kann geschlossen werden, dass Iopromid mit Paclitaxel keine Molekülaggregate von >50 nm bildet, die eine Stabilisierung der Lösung erklären würden. Die durchschnittliche Teilchengröße liegt unter 10 nm.

Abbildung 25:  
Teilchengrößen-  
bestimmung mit PCS

Ultravist® 370  
mit 1% Ethanol (V/V)

Durchschnittliche  
Teilchengröße : 6,9 nm

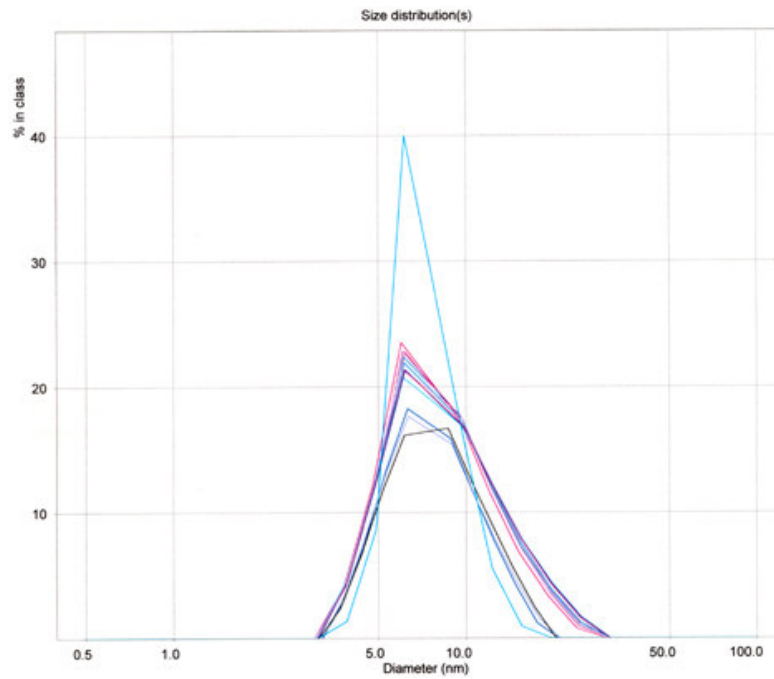
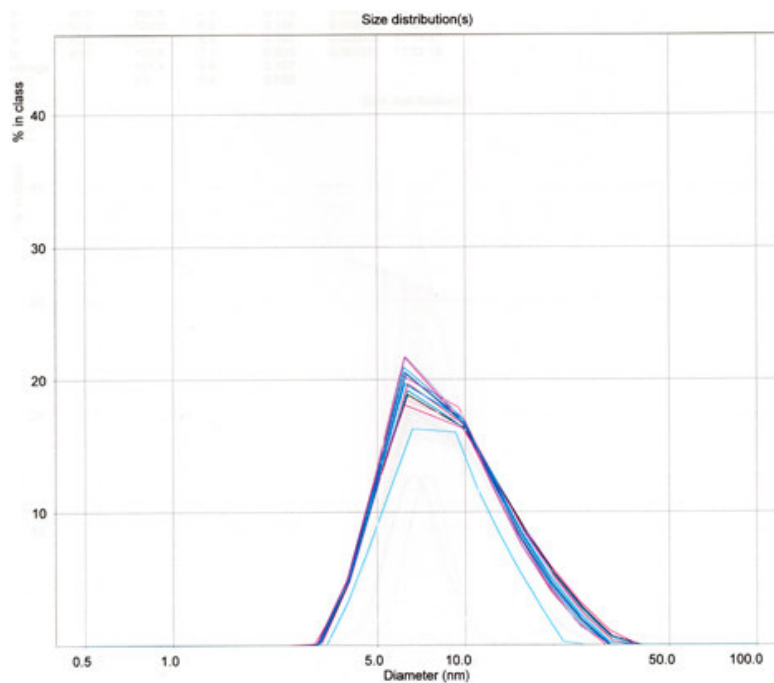


Abbildung 26:  
Teilchengrößen-  
bestimmung mit PCS

200  $\mu$ M Paclitaxel  
in Ultravist® 370  
mit 1% Ethanol (V/V)

Durchschnittliche  
Teilchengröße: 7,0 nm



### 4.2.2.3. Lagerungsstabilität von Paclitaxel in Ethanol

Vor dem Hintergrund der chemischen Instabilität des Wirkstoffes Paclitaxel in wässrigen Medien ist es nicht möglich, eine übersättigte Paclitaxellösung in Ultravist® über längere Zeit zu lagern. Aus diesem Grund muss eine Paclitaxellösung in Ethanol hergestellt werden, die unmittelbar vor der Applikation auf einfache Weise in das Kontrastmittel eingespritzt werden kann. Daher wäre es zweckmäßig diese Lösungen bereits in gewünschten Volumina in Fertigspritzen vorrätig zu halten.

Ziel der Untersuchung war festzustellen, wie lange die ethanolischen Lösungen bei verschiedenen Lagerungstemperaturen in Fertigspritzen haltbar (Wirkstoffgehalt  $\pm$  5% der Deklaration) sind.

Untersucht wurden neben der chemischen und physikalischen Stabilität der Lösung des Wirkstoffs in Abhängigkeit von Lagerungsdauer und Temperatur auch die Eignung der Fertigspritzen als Behältnis für eine längere Lagerung hinsichtlich Dichtigkeit während und Entleerbarkeit nach der Lagerung.

Sämtliche Fertigspritzen ließen sich nach Ablauf der Lagerungszeit völlig problemlos entleeren. Ein auf Undichtigkeit hinweisender erheblicher Gewichtsverlust ließ sich nur nach Lagerung bei 60°C nachweisen (siehe Tabelle 11 und Abbildung 27). Nach 3 Monaten gingen hier etwa 1,5% des Ethanols verloren.

Tabelle 11: Massenveränderung in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur und -dauer

Lagerungs- temperatur	Durchschnittliche Massenveränderung (in Gramm) während der Lagerung in Fertigspritzen nach						
	0 Monaten	0,5 Monaten	1 Monat	2 Monaten	3 Monaten	6 Monaten	12 Monaten
-20°C	0	0,0003	0,0002	0,0004	0,0005	0,0005	0,0004
2-8°C	0				0,0022	0,0033	0,0036
25°C	0	0,0001	0,0005	0,0004	0,0002	0,0001	0,0002
40°C	0	-0,0002	-0,0005	-0,0006	-0,0018		
60°C	0	-0,0028	-0,0038	-0,0070	-0,0116		

Abbildung 27: Massenveränderung in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur und -dauer

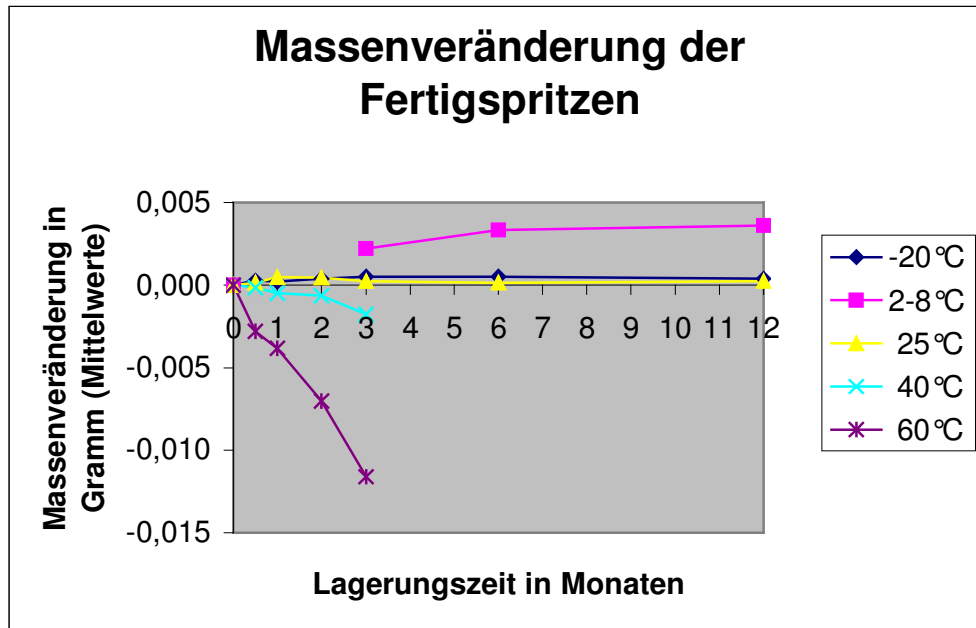
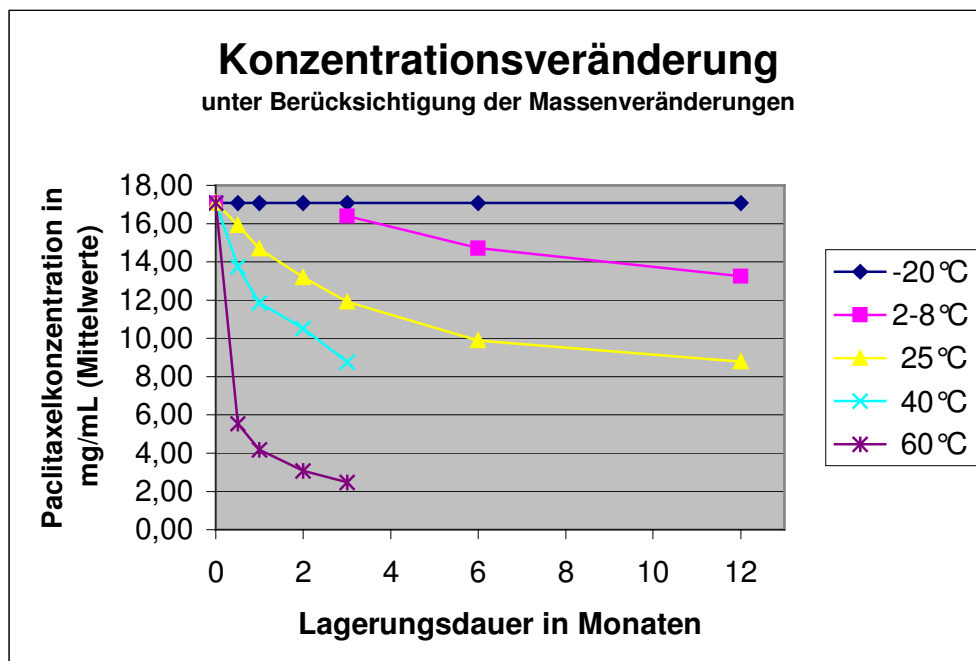


Abbildung 28: Konzentrationsveränderung in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur und -dauer



Eine gute Langzeitstabilität von Paclitaxel in Ethanol konnte in den Fertigspritzen aber nur durch Lagerung bei -20 °C erzielt werden. Bereits bei Kühlschranklagerung (2-8 °C) waren nach 6 Monaten 14% des Wirkstoffs abgebaut (siehe Abbildung 28). Eine solche Abbaurate ist pharmazeutisch natürlich nicht vertretbar.

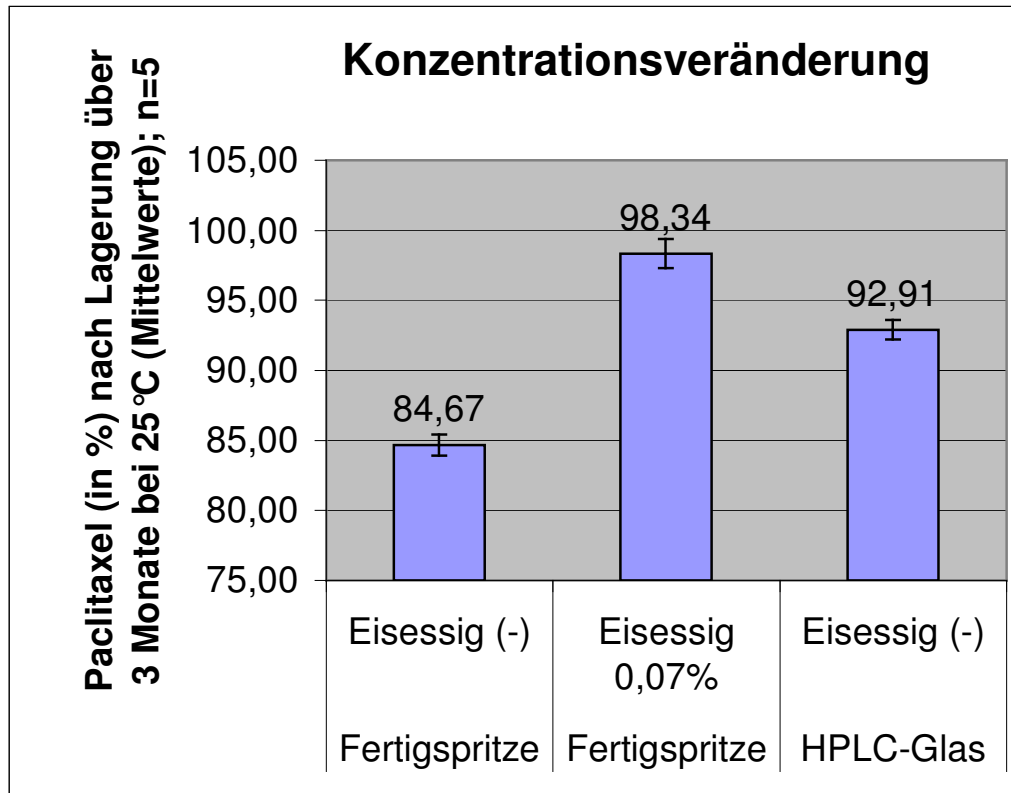
Deshalb wurde in einem weiteren Versuch geprüft, ob sich die Stabilität durch Verwendung anderer Lagerungsgefäße oder durch Erniedrigung des pH-Wertes der Lösung durch Zusatz einer geringen Menge Eisessig erhöhen lässt.

Tatsächlich konnte die Lagerungsstabilität der Lösung von Paclitaxel in absolutem Ethanol (17,08 mg/mL) durch Verwendung von HPLC-Probengefäßen zur Lagerung deutlich verbessert werden. Die besten Ergebnisse wurden aber durch Lagerung in den Fertigspritzen erzielt, wenn eine geringe Menge Eisessig (0,07%) zugesetzt wurde (siehe Abbildung 29). Nach 3-monatiger lichtgeschützter Lagerung bei Raumtemperatur wurden in den Fertigspritzen mit Eisessigzusatz noch über 98,3% des Wirkstoffs wiedergefunden, während es ohne ihn nur 84,7% waren. Negative Auswirkungen auf die Entleerbarkeit und Dichtigkeit (siehe Tabelle 12) der Fertigspritzen hatte der Zusatz der geringen Eisessigmenge nicht.

Tabelle 12: Einfluss von Eisessigzusatz und Art des Lagerungsgefäßes auf die Massenveränderung während der Lagerung

Lagerungs- temperatur	Lagerungs- Gefäß	Eisessig- gehalt	Durchschnittliche Massenveränderung (g) nach 3 Monaten (Mittelwerte)
-20 °C	Fertigspritze	(-)	0,0000
25 °C	Fertigspritze	(-)	-0,0001
-20 °C	Fertigspritze	0,07%	0,0002
25 °C	Fertigspritze	0,07%	0,0000
-20 °C	HPLC-Glas	(-)	0,0016
25 °C	HPLC-Glas	(-)	0,0011

Abbildung 29: Auswirkungen von Eisessigzusatz und Art des Lagerungsgefäßes auf die Konzentrationsveränderung während der Lagerung



#### 4.2.2.4. In-vivo-Aufnahme des Wirkstoffs

Im Tierversuch konnte der schnelle Transfer des Paclitaxels in die Gefäßwände nach intrakoronarer Injektion Paclitaxel enthaltender Ultravist®-Zubereitungen gezeigt werden [65].

Bei Schweinen wurde die Ultravist®-Paclitaxel-Zubereitung selektiv durch Katheter in die linke Koronararterie injiziert. Die Injektion erfolgte portionsweise über einen Zeitraum von mehreren Minuten. Nach jeder einzelnen Applikation trat das Paclitaxel-Kontrastmittel-Gemisch direkt für 5 bis 10 Sekunden mit der Gefäßwand in Kontakt, da das Blut für diesen Zeitraum komplett aus der Arterie verdrängt wurde. In

die unbehandelte rechte Koronararterie konnte der Wirkstoff dagegen erst nach Rezirkulation und entsprechender Verdünnung im Organismus gelangen. Die etwa 15 Minuten nach Applikation entnommenen, behandelten linken und unbehandelten rechten Koronararterien zeigten signifikant unterschiedliche Paclitaxelkonzentrationen, welche den gezielten Paclitaxeltransport mittels Kontrastmittel widerspiegelten.

Die höchste Gewebekonzentration in der linken Koronararterie wurde nach Applikation von 80 mL Ultravist® 370, welches Paclitaxel 200 µmolar (170,8 µg/mL) enthielt, erreicht. 40 mL dieser und 80 mL einer 100 µmolaren (85,4 µg/mL) Zubereitung lieferten – die Dosisreduktion widerspiegelnd – annähernd gleiche Resultate (siehe Tabelle 13).

Die zum Vergleich applizierte, höher konzentrierte, kontrastmittelfreie, auf dem Fertigarzneimittel Taxol® basierende Zubereitung wurde von den Schweinen schlechter vertragen (2 der 3 Tiere zeigten Pulsanstieg und Rötung der Haut) und führte zu niedrigeren und individuell heterogeneren Gewebekonzentrationen (siehe Tabelle 13). Taxol® enthält Cremophor EL als O/W-Emulgator, um das sehr lipophile Paclitaxel durch Aufnahme in Mizellen in Lösung bringen zu können. Möglicherweise verringerte im Tierversuch dieser Einschluss des Wirkstoffs in die Mizellen einen raschen Transfer in die Gefäßwände.

Die Gewebekonzentrationen von Paclitaxel im Myokard nahe der behandelten Arterien korrelierten mit den in Kontrastmittel applizierten Gesamtdosen des Wirkstoffes und reichten bis 10 µM (8,54 µg/mL). Bei Verwendung der auf Taxol® basierenden Zubereitung ergab sich eine – im Verhältnis zur applizierten Dosis – vergleichsweise geringe Gewebekonzentration.



Tabelle 13: Paclitaxel-Gewebekonzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) 15 Minuten nach der letzten Injektion der verschiedenen paclitaxelhaltigen Zubereitungen

Volumen	80 mL KM	80 mL KM	40 mL KM	~10 mL KM	10 mL Taxol®
Paclitaxelkonzentration	200 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	1405 $\mu\text{M}$
Paclitaxeldosis	16 $\mu\text{mol}$	8 $\mu\text{mol}$	8 $\mu\text{mol}$	2 $\mu\text{mol}$	14 $\mu\text{mol}$
LAD proximal	2,80 $\pm$ 0,86	2,32 $\pm$ 0,93	3,40 $\pm$ 3,82	nd***	0,82 $\pm$ 0,76
stented	4,69 $\pm$ 0,95	3,01 $\pm$ 0,68	2,20 $\pm$ 1,78	nd***	3,55 $\pm$ 0,59
distal	5,19 $\pm$ 1,19	2,83 $\pm$ 0,27	3,38 $\pm$ 1,13	nd***	2,35 $\pm$ 0,90
CX proximal	4,34 $\pm$ 0,56	2,00 $\pm$ 0,68	1,68 $\pm$ 0,50	nd***	nd
stented	5,17 $\pm$ 2,67	3,05 $\pm$ 0,74	3,40 $\pm$ 1,79	nd***	0,95 $\pm$ 0,90
distal	9,50 $\pm$ 2,60	4,82	3,52 $\pm$ 2,50	nd***	1,31 $\pm$ 0,98
LAD,CX: alle Segmente, n =	5,28 $\pm$ 2,54 18	2,89 $\pm$ 1,08 17	2,92 $\pm$ 2,04 18	nd*** 18	1,48 $\pm$ 1,36 18
Rechte Koronararterie	0,71 $\pm$ 0,64	nd	nd	nd	nd
Myokard (nahe LAD, CX)	10,4 $\pm$ 1,7*	4,89 $\pm$ 0,65*	5,82 $\pm$ 2,22**	1,97 $\pm$ 0,66*	3,94 $\pm$ 0,59*

nd = nicht detektierbar; \* n = 6, zwei Proben pro Herz; \*\* n = 4, zwei Proben pro Herz, \*\*\* 14 von 18 Proben unter Detektionslimit

In den unbehandelten rechten Koronararterien wurden nur sehr geringe Paclitaxelmengen wiedergefunden und auch die Plasmakonzentrationen waren 10 Minuten nach der letzten Injektion nur noch 0,07  $\mu\text{molar}$  (0,06  $\mu\text{g/mL}$ ) und damit erfreulich gering (siehe Tabelle 14). Als Plasmaspiegel bei der Tumortherapie sind 1-10  $\mu\text{molare}$  Konzentrationen (0,85-8,54  $\mu\text{g/mL}$ ) gebräuchlich.

Tabelle 14: Paclitaxelkonzentrationen in Plasma 10 Minuten nach der letzten Injektion der verschiedenen Paclitaxelzubereitungen

Paclitaxelzubereitung	Paclitaxeldosis $\mu\text{mol}$	Plasmakonzentration $\mu\text{M}$
80 mL KM, 200 $\mu\text{M}$ Paclitaxel	16	$0,073 \pm 0,007$
80 mL KM, 100 $\mu\text{M}$ Paclitaxel	8	$0,029 \pm 0,004$
40 mL KM, 200 $\mu\text{M}$ Paclitaxel	8	$0,046 \pm 0,007$
10 mL KM, 200 $\mu\text{M}$ Paclitaxel	2	nd
10 mL Taxol <sup>®</sup> , 1405 $\mu\text{M}$ Paclitaxel	14	$0,066 \pm 0,048$

n = 3 Tiere pro Zubereitung; nd = nicht detektierbar

### **4.3. Paclitaxel auf Magnetiten**

Von der Beschichtung der Magnetite bis zur quantitativen Analytik des aufgetragenen Wirkstoffes Paclitaxel waren, wie unter 3.3. beschrieben, mehrere verschiedene Arbeitsschritte zur Trennung der einzelnen Fraktionen notwendig. Nach der eigentlichen Beschichtung (3.3.1) wurden die Magnetite zunächst von überschüssigem Wirkstoff abgetrennt. Das erfolgte durch Extraktion mit Ether (3.3.2.1.) oder aber Separation mit Magnetsäulen (3.3.2.2.). Um den Wirkstoff der HPLC-Analytik zuführen zu können, musste anschließend ein Verfahren zur Entfernung der Magnetite entwickelt werden, da diese voraussichtlich die HPLC-Säule nicht passieren würden. Mittels Vakuumevaporation (3.3.3.) wurde zunächst die wässrige Phase entfernt, bevor mit absolutem Ethanol der Wirkstoff aus dem festen Rückstand extrahiert und der HPLC-Analytik zugeführt werden konnte.

Die beiden Separationsmethoden, Extraktion mit Ether beziehungsweise die Separation mit Magnetsäulen, wurden auf ihre Anwendbarkeit bei der Herstellung beschichteter Magnetite in der Folge genauer untersucht.

#### **4.3.1. Beschichtung von Magnetiten und anschließende Extraktion mit Ether**

Die unter 3.3.2.1. ausführlich beschriebene Extraktion mit Ether diente der Abtrennung des während der Beschichtung ausgefallenen oder gelösten Wirkstoffes von den beschichteten Magnetiten. Dabei wurden neben magnetithaltigen Zubereitungen zum Vergleich auch reine Mannitollösungen mit 42,7 µg Paclitaxel in Form ethanolischer Lösung versetzt, um den während der anschließenden Extraktion mit Ether verfahrensbedingt unvermeidlich auftretenden Fehler bestimmen zu können.

In einem ersten Schritt wurde der durch die Extraktion mit Ether abgetrennte, ungebundene Wirkstoff quantitativ ermittelt, indem die Etherphase komplett abgedampft wurde. Das zurückbleibende Paclitaxel konnte anschließend in 0,5 mL absolutem Ethanol aufgenommen und der HPLC-Analytik zugeführt werden (siehe Tabelle 15).

Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Wirkstoffgehalt direkt aus einer ethanolischen Lösung (42,7 µg Paclitaxel in 0,55 mL) ohne vorherige Extraktion bestimmt.

Tabelle 15: Extraktion mit Ether zur Separation beschichteter Magnetite – Bestimmung des nicht gebundenen Paclitaxels

Art der Probe	Flächeninhalt des Paclitaxelpeaks	Mittelwerte	Paclitaxelgehalt in µg/mL	Nichtgebundenes Paclitaxel in µg	Wiederfindung in %
Standard	752.379		20,00		
Ethanol	2.888.227	2.876.295	76,78	42,23	98,89
Ethanol	2.888.654		76,79	42,23	98,91
Ethanol	2.852.005		75,81	41,70	97,65
Leerprobe	0		0,00	0,00	0,00
Mannitol	2.608.746	2.743.479	69,35	34,67	81,20
Mannitol	2.851.304		75,79	37,90	88,75
Mannitol	2.770.388		73,64	36,82	86,23
Magnetite	1.874.795	1.947.548	49,84	24,92	58,36
Magnetite	2.152.373		57,22	28,61	67,00
Magnetite	1.815.475		48,26	24,13	56,51

Aus den Mannitollösungen konnte der Wirkstoff durch Ausschütteln mit Ether zu etwa 85% wiedergewonnen werden, aus den Magnetitzubereitungen nur zu rund 60%. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich die Differenz auch nach dem Ausschütteln mit Ether unverändert auf den Magnetiten befindet.

Zur Kontrolle wurde in einem zweiten Schritt die wässrige Phase mit dem gebundenen Wirkstoff einer Vakuumevaporation unterzogen und der verbleibende Rückstand mit 1 mL absolutem Ethanol extrahiert und analysiert (siehe Tabelle 16).

Diese Messungen bestätigten die vorherigen Ergebnisse. Bis zu 14 µg Paclitaxel – das entspricht etwa 33% der eingesetzten Wirkstoffmenge – verblieben nach der Extraktion mit Ether auf den Magnetiten. Die zum Versuch verwendete Magnetitzubereitung enthielt 0,05 mol Eisen pro Liter. Verwendet wurden jeweils 0,5 mL dieser Zubereitungen, so dass jede magnetithaltige Probe etwa 1,4 mg Eisen (1,9 mg Eisen (II/III) -oxid) enthielt. 14 µg Paclitaxel pro 1,4 mg Eisen entsprechen dann einer Wirkstoffkonzentration von 10 µg pro mg Eisen.

Tabelle 16: Extraktion mit Ether zur Separation beschichteter Magnetite –  
Bestimmung des an die Magnetite gebundenen Paclitaxels

Art der Probe	Flächeninhalt des Paclitaxelpeaks	Mittelwerte	Paclitaxelgehalt in µg/mL	Wiedergefundenes Paclitaxel in µg	Wiederfindung in %
Standard	756.136		20,00		
Leerprobe	0		0,00	0,00	0,00
Mannitol	27.420		0,73	0,73	1,70
Mannitol	32.594	23.534	0,86	0,86	2,02
Mannitol	10.588		0,28	0,28	0,66
Magnetite	539.022		14,26	14,26	33,39
Magnetite	368.286	479.898	9,74	9,74	22,81
Magnetite	532.385		14,08	14,08	32,98

#### 4.3.2. Beschichtung von Magnetiten und anschließende Separation mit Magnetsäulen

Die unter 3.3.2.2. ausführlich beschriebene Separation mit Magnetsäulen basiert auf der Vorstellung, die beschichteten Magnetite von dem bei der Beschichtung ausgefallenen beziehungsweise in Lösung gegangenen Wirkstoff durch Anlegen eines Magnetfeldes an die Magnetsäule abtrennen zu können.

Die beschichteten Magnetite sollten genau so lange auf der Säule verbleiben, wie das Magnetfeld angelegt war, während überzähliger Wirkstoff bereits vorher mit Mannitollösung oder aber erst später mit Isopropanol von der Magnetsäule gewaschen werden sollte. Dieses Verfahren erwies sich als langwierig, aber prinzipiell praktisch durchführbar. Die anschließend auf den Magnetiten nachgewiesene Wirkstoffmenge war nach Einsatz dieses Verfahrens allerdings erheblich geringer als nach Verwendung der Etherextraktion.

Die Beschichtung der Magnetite erfolgte, wie unter 3.3.1. beschrieben. In ersten Untersuchungen enthielten die auf die Säule gegebenen Zubereitungen 42,7 µg Paclitaxel in 1 mL der jeweiligen Probe. In den anschließend eluierten Probenfraktionen konnte Eisen photometrisch und Paclitaxel mittels HPLC quantitativ bestimmt werden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Separation beschichteter Magnetite mit Magnetsäulen I

Probenart	Proben- bezeichnung	Eisengehalt in mg/mL	Paclitaxelkonzentration in µg/mL	Paclitaxel pro mg Eisen in µg	Anmerkung
Magnetitproben	Magnetit 0	1,0148	0,0000	0,0000	Leerprobe
	Magnetit 1	0,8814	0,0570	0,0646	
	Magnetit 2	0,9044	0,0812	0,0898	
	Magnetit 3	1,0148	0,0868	0,0855	
Mannitolproben	Mannitol 0	0,0000	0,0000	-	Leerprobe
	Mannitol 1	0,0000	0,0344	-	
	Mannitol 2	0,0000	0,0389	-	

In den Proben, die beschichtete Magnetite enthielten, ließen sich durchschnittlich 0,0800 µg Paclitaxel pro Milligramm Eisen nachweisen. Bedenkt man aber, dass auch die zum Vergleich mitgeführten und gleich behandelten reinen Mannitollösungen auch noch geringe Mengen des Wirkstoffes enthielten, so lag die durchschnittlich an die Magnetite gebundene Wirkstoffmenge sogar unter 0,05 µg pro Milligramm Eisen.

Da diese Ergebnisse weit hinter denen der Separation durch Etherextraktion zurückblieben, wurde in der Folge ein weiterer Versuch mit 10-fach höherer Paclitaxelkonzentration in der Beschichtungslösung durchgeführt. 427 µg/mL des Wirkstoffes wurden, wie unter 3.3.1. beschrieben, eingesetzt (siehe Tabelle 18). Die Resultate der Separation durch Etherextraktion wurden dennoch nicht erreicht.

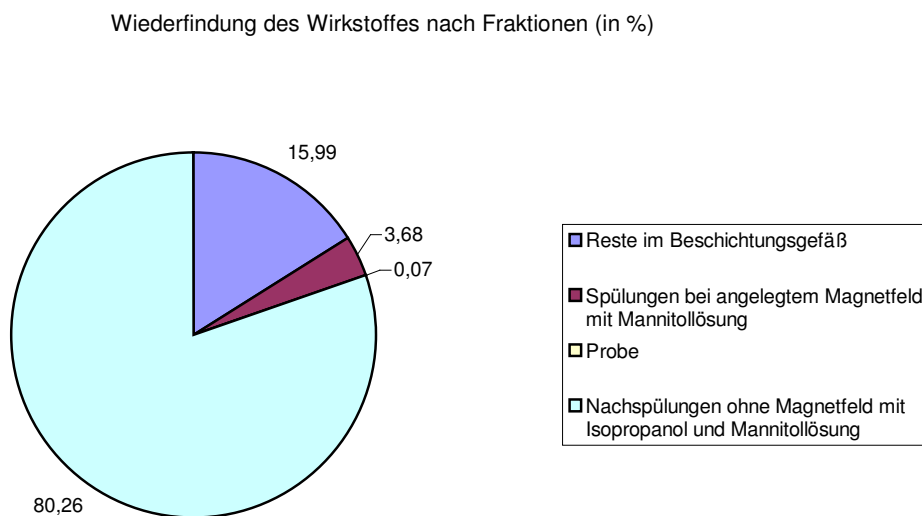
Tabelle 18: Separation beschichteter Magnetite mit Magnetsäulen II

Probenart	Proben- bezeichnung	Eisengehalt in mg/mL	Paclitaxelkonzentration in µg/mL	Paclitaxel pro mg Eisen in µg	Anmerkung
Magnetitproben	Magnetit 0	0,7535	0,0000	0,0000	Leerprobe
	Magnetit 1	0,8191	0,2827	0,3451	
	Magnetit 2	0,7910	0,2301	0,2909	
	Magnetit 3	0,7957	0,3833	0,4817	
Mannitolproben	Mannitol 0	0,0000	0,0000	-	Leerprobe
	Mannitol 1	0,0000	0,1963	-	
	Mannitol 2	0,0000	0,2284	-	
	Mannitol 3	0,0000	0,2897	-	

In den Proben, die beschichtete Magnetite enthielten, ließen sich jetzt durchschnittlich 0,3726 µg Paclitaxel pro Milligramm Eisen nachweisen. Allerdings enthielten bei Verwendung höherer Beschichtungskonzentrationen auch die zum Vergleich mitgeführten und ebenso behandelten reinen Mannitollösungen etwas höhere Mengen des Wirkstoffes, so dass die durchschnittlich an die Magnetite gebundene Wirkstoffmenge unter 0,08 µg pro Milligramm Eisen blieb.

Es ist in diesem Zusammenhang interessant zu wissen, wann der eingesetzte Wirkstoff tatsächlich wieder von der Säule gespült wird. Dazu wurden alle Fraktionen gesammelt und analysiert (siehe Abbildung 30).

Abbildung 30: Wiederfindung des Wirkstoffes nach der Separation der Magnetite mit Magnetsäulen



Es zeigte sich, dass etwa 16 Prozent des eingesetzten Wirkstoffes im Beschichtungsgefäß verblieben, also nicht auf die Magnetsäule aufgebracht wurden. Es erscheint naheliegend, dass es sich dabei vorrangig um bei der Beschichtung ausgefallenes Paclitaxel handelt. Problematisch ist das nicht, da ein vollständiges Aufbringen der Zubereitung bei diesem Verfahren nicht notwendig ist.

Von großer Bedeutung ist dagegen, dass nicht einmal 4 Prozent des zur Beschichtung eingesetzten Wirkstoffes – das sind weniger als 5 Prozent des tatsächlich auf die Säule aufgebrauchten Wirkstoffes – bei angelegtem Magnetfeld mit Mannitollösung von der Säule gewaschen wurde. Auch als das Magnetfeld entfernt und die Magnetitfraktion mittels Mannitollösung eluiert wurde, verblieb die überwiegende Wirkstoffmenge auf der Säule und wurde erst durch das Nachspülen mit Isopropanol von dieser gelöst.

Der Wirkstoff Paclitaxel hat offensichtlich eine hohe Affinität zur stationären Phase der Magnetsäule. Möglicherweise lassen sich damit auch die vergleichsweise geringen Wirkstoffmengen erklären, die anschließend auf den Magnetiten gefunden wurden. Das Paclitaxel könnte während des Kontaktes der Magnetite mit der Säule, auf die stationäre Phase übergegangen sein.