

## 2 Materialien

Bei den verwendeten Rohstoffen handelt es sich nur teilweise um chemisch definierte Einzelsubstanzen. Vor allem im Bereich der Lipide und Emulgatoren können sich die Zusammensetzungen herstellerabhängig leicht unterscheiden. Daher wurden z.T. die Herstellerbezeichnungen mit angegeben.

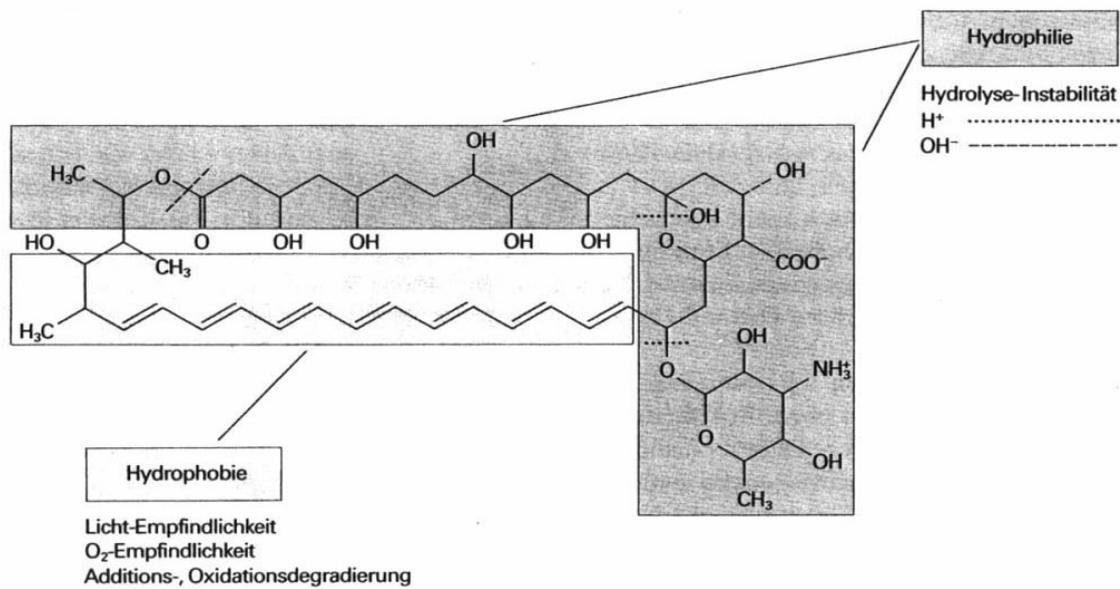
### 2.1 Modellarzneistoff Amphotericin B und seine Aufbereitung für den parenteralen Applikationsweg

#### 2.1.1 Amphotericin B

Bei dem Wirkstoff Amphotericin B handelt es sich um ein makrozyklisches Polyantibiotikum mit der Summenformel  $C_{47}H_{73}NO_{17}$  und einem Molekulargewicht von 924,11 (Pyle, 1981). Amphotericin B wird aus Kulturen von *Streptomyces nodosus* isoliert und wurde 1955 erstmalig beschrieben. Als natürliches Fermentationsprodukt entsteht auch Amphotericin A. Obwohl beide Moleküle antifungale Wirkung aufweisen, hat sich nur Amphotericin B als Therapeutikum durchgesetzt. Das gelb-orange, nahezu geruchlose und geschmacklose Pulver wurde von der Firma Alpharma ApS (Kopenhagen, Dänemark) als USP-Produkt bezogen.

Das Heptaenmakrolid weist eine stark hydrophobe Seite auf mit sieben konjugierten Doppelbindungen und einer hydrophilen Seite, einschließlich des glykosidisch gebundenen Aminozuckers Mykosamin.

Der Laktonring enthält 38 Ringatome, außer einer Heptaenkette noch zahlreiche Hydroxylgruppen und ein zyklisches 6-Ring-Ketal, das die Kohlenstoffatome  $C_{13}$  und  $C_{17}$  miteinander verbindet. Das amphotere Verhalten, das dem Arzneistoff seinen Namen gab (Heit and Riviere, 1995), kann mit der Carboxylgruppe am Hauptring und mit der primären Aminogruppe am Mykosamin erklärt werden. Amphotericin B kann in saurem oder basischem Medium Salze bilden (Merck, 1996; Plumb, 1999). Diese Salzverbindungen sind besser wasserlöslich, doch besitzen sie eine geringere antifungale Wirkung als die Grundsubstanz (Plumb, 1999).



**Abb. 2-1: Amphotericin B-Struktur und physikochemische Eigenschaften (Forth et al., 1996)**

Wegen seiner starken hydrophoben Eigenschaften ist der Arzneistoff bei pH 6-7 wasserunlöslich (Gummow et al., 1994; Windholz et al., 1983), im stark sauren bzw. alkalischen Bereich (< pH 2 und > pH 11) mit ungefähr 0,1 mg/mL (Beck et al., 1982) sehr schwer löslich und instabil (Bennett, 1995; Pyle, 1981; Windholz et al., 1983). Am ehesten löst es sich in polaren organischen Lösungsmitteln wie DMSO, Dimethylformamid oder Methanol. Aufgrund des Doppelbindungssystems weist der Arzneistoff eine hohe Licht- und Oxidationsempfindlichkeit auf und durch die hydrophile Seite eine gewisse Hydrolyse-Instabilität. Diese Eigenschaften müssen beim Umgang mit Amphotericin B berücksichtigt werden. Das Pulver ist kühl (2-8 °C) und unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluss zu lagern (Sigma-Aldrich, 2000). Bei der Verarbeitung sollten starke pH-Schwankungen vermieden werden. Der Laktoring wird im Alkalischen gespalten, das Ketal und die glykosidische Bindung mit dem Aminozucker zeigen Empfindlichkeit gegenüber sauren Bedingungen (Abb. 2-1).

Während Nystatin und Natamycin als weitere Vertreter der Polyenantimykotika aufgrund ihrer Toxizität nur lokal eingesetzt werden können, lässt sich Amphotericin B auch intravenös applizieren. Nach oraler oder lokaler Gabe wird es fast nicht resorbiert.

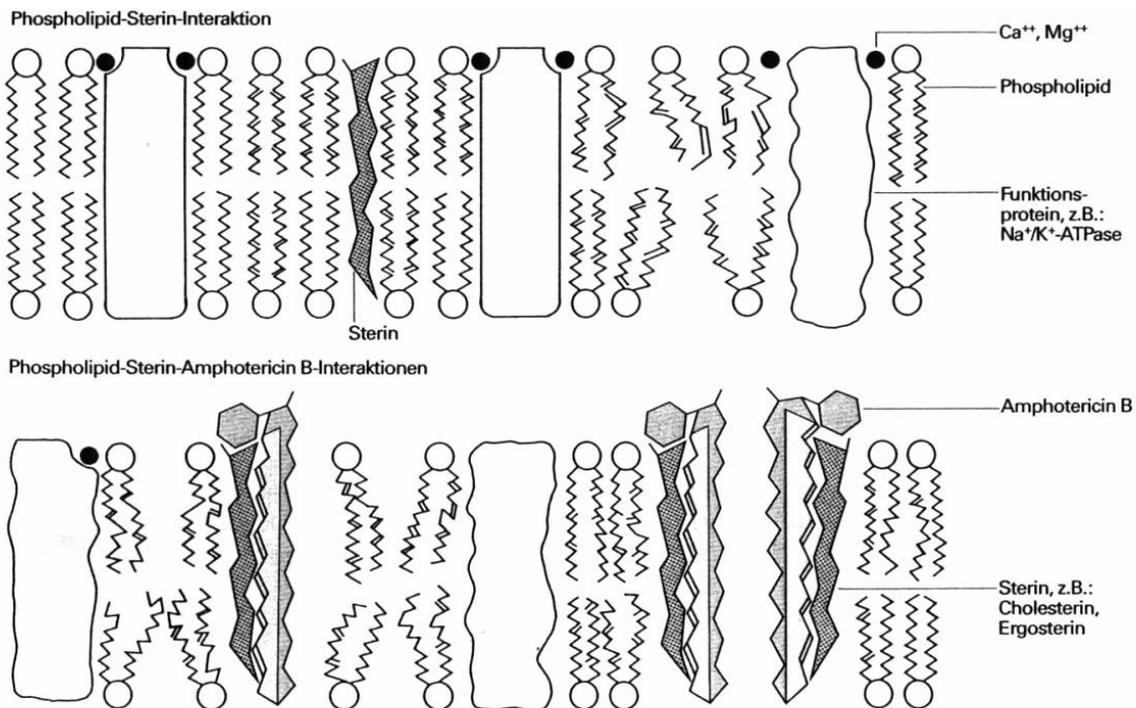
Amphotericin B besitzt ein breites therapeutisches Wirkungsspektrum. Es zeigt gute Wirksamkeit bei Candidosen (Hefepilzinfektion der Gattung *Candida*), Aspergillosen

(Schimmelpilzinfektion), Kryptokokkosen (Infektion mit dem Hefepilz der Gattung *Cryptococcus*), Histoplasmosen (Infektion mit *Histoplasma capsulatum*) und Infektionen mit *Blastomyces*- und *Mucor*-Arten. Des Weiteren kommt es bei Protozoen-Erkrankungen, insbesondere gegen den Parasiten der Gattung *Leishmania*, zum Einsatz. Resistenzentwicklungen wurden bisher kaum beobachtet. Wegen fehlender Membransterine sind Bakterien unempfindlich gegenüber Amphotericin.

Der Wirkungsmechanismus und die Nebenwirkungen stehen unmittelbar in Zusammenhang mit der Struktur der Substanz und der Ähnlichkeit zu den Sterinen, Ergosterin (befindet sich in der Zellmembran der Pilze) und Cholesterin (in den Membranen menschlicher Zellen). Amphotericin und die Sterine besitzen ein starres, planares, hydrophobes, durchkonjugiertes Doppelbindungssystem von ähnlicher Länge. Sie reagieren untereinander mit starken hydrophoben Wechselwirkungen. Die Affinität zu Cholesterol ist fast so hoch wie zu Ergosterin, wodurch die starken Nebenwirkungen, die bei einer systemischen Anwendung beobachtet werden, zu erklären sind.

Die Abbildung 2-2 stellt die Funktion der Membransterine und die Auswirkung der Amphotericin B-Bindung auf die Membran dar (Forth et al., 1996). Membranphospholipide liegen normalerweise dicht gepackt und parallel aneinander. Diese Lage ist vereinfacht, wenn sie gesättigte Fettsäuren enthält. Ungesättigte Fettsäuren werden durch die Membransterine in diese Position gezwungen. Zusätzlich ist das Funktionsprotein ebenfalls eingengt. Die Membran erhält somit eine Fluiditäts- und Permeabilitätsminderung. Diese ist für die Funktion der Zelle von essentieller Bedeutung. Durch die Anlagerung von Amphotericin B an die Sterine wird die hydrophile Seite des Wirkstoffs den Phospholipiden zugekehrt. Die vorher enge Anordnung lockert sich auf, und demzufolge verändert sich die Permeationseigenschaft der Membran. Reichern sich größere Mengen Amphotericin B-Moleküle in der Membran an, können die Moleküle nicht-wässrige Poren bilden, die zu einer Durchlässigkeit von monovalenten Kationen (ausgenommen Protonen) führen (Cohen, 1998). Die osmotische Integrität der Zelle ist zerstört, und es kommt zu einem zellulären Verlust von Elektrolyten. Wenige Minuten nach der Einwirkung von Amphotericin B kommt es zum Efflux von  $K^+$ -Ionen und  $Mg^{2+}$ -Ionen, später von Aminosäuren, kleinen Peptiden und Nukleinsäurederivaten (Mykosen Online Redaktion, 2002b). Zunächst ist die Zelle nur in ihrem Wachstum gehemmt, stirbt aber noch nicht. Ab einer „kritischen“ Amphotericin B-Konzentration werden durch Interaktion der Sterine mit nicht-wässrigen Poren wässrige Poren gebildet. Diese sind für  $H^+$ ,  $OH^-$  und zweiwertige Kationen permeabel. Die durch die Permeabilitätsänderung eingeleiteten osmotischen Vorgänge führen bei Säugerzellen zu einer

Lysis. Aufgrund einer vorhandenen Zellwand führt dies bei Pilzen aber nicht zum Schaden. Bei Pilzen führt die erhöhte  $H^+/OH^-$ -Permeabilität zum Anstieg des intrazellulären pHs, der eine Membranschädigung herbeiführt und die Fungizidie verursacht (Cohen, 1998).



**Abb. 2-2: Die Funktion von Ergosterin/Cholesterin in biologischen Membranen und die Interaktion von Amphotericin B mit den Sterinen (Forth et al., 1996)**

Während der letzten 20 Jahre haben Pilzinfektionen deutlich zugenommen (Bodey et al., 1992). Amphotericin B hat eine herausragende Bedeutung in der Behandlung der lebensbedrohlichen Organmykosen erlangt und bleibt trotz neuer Arzneistoffe, wie z.B. Caspofungin, das Mittel der Wahl. Systemmykosen treten verstärkt bei immunsuppressiven Patienten auf, deren Anzahl weiterhin zunimmt, z.B. durch medikamentöse onkologische Therapien, durch Knochenmarks- oder Organtransplantationen oder HIV-Infektionen (Rothon et al., 1994). Solche Systemmykosen können lebensbedrohlich sein. Daher werden diese Patienten prophylaktisch und bei Fieber häufig mit Antimykotika behandelt.

Bei Verdacht auf eine tiefe Organmykose erfolgt eine Therapie mit langsamer Amphotericin B-Infusion. Man beginnt mit einer täglichen Gabe von 0,1 mg/kg Körpergewicht und erhöht allmählich auf 0,5-0,7 mg/kg Körpergewicht. Eine Plasmahalbwertszeit von 18-24 h berechtigt ein Applikationsintervall von 48 h zwischen den Infusionen. Bei besonders

schweren Fällen kann die Tagesdosis unter Berücksichtigung der toxischen Nebenwirkungen auf maximal 1,0 mg/kg oder auf abwechselnd jeden 2. Tag 1,5 mg/kg Körpergewicht erhöht werden (Bristol-Myers-Squibb, 2001). Eine längere Therapie mit einer mittleren, noch gut verträglichen Dosis scheint effektiver zu sein (Forth et al., 1996; Mutschler et al., 2001).

Nach intravenöser Darreichung verteilt sich die Substanz nach einem Mehrkompartimentenmodell, wobei sich die terminale Halbwertszeit auf bis zu Wochen beläuft. Beim Eintritt in den Blutstrom bindet Amphotericin B zu 91-96% (Block et al., 1974; Morgan et al., 1983) an die hydrophoben Domänen der Plasmaproteine. Aus dem Blutkreislauf wechselt es zu den Membransterinen von Mykoseerregern oder zu Säugergewebszellen über. Die höchsten Organkonzentrationen werden in Leber und Milz erreicht. Signifikante Liquorspiegel werden nicht beobachtet. Trotz alledem kann eine Pilz-Meningitis mit sehr langer Therapiedauer behandelt werden. Amphotericin B bindet lange an sich langsam regenerierende Gewebe (z.B. Leberzellen). Daher löst sich das membrangebundene Depot sehr schleppend. Überwiegend wird das Medikament im Gewebe abgebaut und vorwiegend biliär und fäkal ausgeschieden. 5-10% einer Dosis wird nach 24 h im Urin gefunden. Eine Amphotericin B-Elimination ist noch wochenlang (Arikan and Rex, 2001; Beck et al., 1982) nach Therapieende nachweisbar; Metaboliten sind nicht bekannt.

Bei der Behandlung mit systemischem Amphotericin B treten zu 50-80% massive Nebenwirkungen auf. Es kommt häufig zu Fieber, Schüttelfrost, Muskelschmerzen, Blutbildveränderung und Thrombophlebitis an der Einstichstelle. Ferner können Appetitlosigkeit, Erbrechen oder Durchfall auftreten. Eine Prämedikation, wie z.B. mit Pethidin, Paracetamol, Metamizol und Hydrocortison, kommt daher häufig zum Einsatz.

Als spezifische Nebenwirkungen stehen die Nierenfunktionsstörungen, gekennzeichnet durch die Erhöhung des Serum-Kreatinins über 2,0-2,5 mg/dL oder durch eine Zunahme um 100% oder mehr, als therapielimitierender Faktor im Vordergrund. Bei jedem dritten Patienten sind die Nebenwirkungen so gravierend, dass die Dosis reduziert oder die Therapie abgebrochen werden muss. Gefürchtet sind insbesondere ein akutes Nierenversagen, einhergehend mit einer hohen Mortalität, und irreversible Folgeschäden, wie eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz. Abhängig von der Dosis sind die Schäden mehr oder weniger reversibel. Der Mechanismus scheint auch hier in der Membranschädigung zu liegen. Einer Schädigung des proximalen Tubulus (Lyse der cholesterinreichen lysosomalen Membran) kann mit ausreichender Kochsalzzufuhr vorgebeugt werden. In 20% der Fälle entwickelt sich eine substituitionsbedürftige Hypokaliämie. Bei schweren Leber- und Nierenfunktionsstörungen

oder bei gleichzeitiger Behandlung mit nierentoxischen Stoffen darf keine Amphotericin B-Therapie erfolgen (Bristol-Myers-Squibb, 2001).

### 2.1.2 Fungizone®

Die Infusionstherapie mit Amphotericin B ist nach wie vor die wirksamste Behandlung aller tiefen Organmykosen, unabhängig vom jeweiligen Erreger (Forth et al., 1996). Die z.T. gravierenden Nebenwirkungen dürfen bei einer manifesten Organmykose nicht vom Amphotericin B-Einsatz abhalten. Aufgrund der geringen Löslichkeit wird im Handel erhältliches Amphotericin B mit Natriumdesoxycholat als Lösungsvermittler ergänzt. Dieses „klassische“ Amphotericin B-Desoxycholat steht seit 1960 unter dem Handelsnamen Fungizone® (Bristol-Myers Squibb GmbH, Bedfordviwe, USA) zur Verfügung und wird in Deutschland als Amphotericin B (Bristol-Myers Squibb GmbH, D-München) angeboten. Eine Flasche mit Amphotericin B-Trockensubstanz besteht aus 50 mg Amphotericin B, 41 mg Natriumdesoxycholat und einem Natriumphosphatpuffer (Bristol-Myers-Squibb, 2001). Dieser Komplex bildet Kolloide im Wasser mit Partikeln, die einen Durchmesser von weniger als 0,4 µm aufweisen. Filter für die intravenöse Infusion (0,22 µm) sorbieren einen großen Anteil an Wirkstoff (Bennett, 1995). Zur Zubereitung der Infusionslösung wird zunächst eine Stammlösung durch Zugabe von 10 mL Wasser für Injektionszwecke hergestellt (5 mg/mL). Nach kräftigem Schütteln der Flasche entsteht eine klare Lösung. Mit 5%iger Glucoselösung (der pH-Wert muss über 4,5 sein) wird unmittelbar vor der Infusion auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Stammlösung ist, vor Licht geschützt, bei Raumtemperatur 24 h lang stabil. Wird sie im Kühlschrank aufbewahrt, so erfährt sie während einer Woche keinen Wirkungsverlust (Plumb, 1999; Pyle, 1981). Es bestehen Inkompatibilitäten mit elektrolythaltigen Lösungsmitteln (Kochsalzlösungen und anderen Arzneimitteln). Konservierungsmittel sowie andere als die vorgeschriebenen Lösungsmittel können zum Ausfällen von Amphotericin B führen. Bei einem pH-Wert von unter 5 neigen die kolloidalen Partikel zur Koagulation.

Die Therapie erfolgt einschleichend mit 0,1 mg/kg Körpergewicht und kann täglich um 0,1-0,2 mg/kg auf 0,5-0,7 mg/kg, gegebenenfalls höher, erhöht werden.

Die unakzeptablen Nebenwirkungen, insbesondere die Nephrotoxizität, geben seit Jahren Anlass, nach einer besser verträglichen Formulierung zu suchen, mit gleicher oder sogar höherer Effektivität. Patienten, die gleichzeitig mit anderen nierenschädigenden

Medikamenten behandelt werden müssen oder schon eine Nierenschädigung vorweisen, könnten somit auch einer Amphotericin B-Therapie zugeführt werden.

Zumischungen von Amphotericin B zu parenteralen Fettemulsionen führten zu einer verminderten Nephrotoxizität (Caillot et al., 1994; Kirsh et al., 1988). Allerdings wurde bei den entsprechenden Versuchen z.T. von ausgeprägten physikalischen Inkompatibilitäten (Heide, 1997; Ranchere et al., 1996; Trissel, 1995) und Teilchengrößenzunahmen (Schöffski et al., 1998; Shadkhan et al., 1997) berichtet. Somit wäre eine parenterale Anwendung zu risikoreich (siehe Kap. 2.1.8).

Die geringe Wasserlöslichkeit, die bessere Lipidlöslichkeit und die membranaktive Eigenschaft lassen Amphotericin B zu einem Kandidaten für Arzneistoff-Lipid-Interaktionsstudien werden. Einige lipid-basierende Formulierungen konnten bereits eine Zulassung erhalten. Im Vergleich zum konventionellen Amphotericin B weisen sie ein geringeres Nebenwirkungsprofil auf. Besonders die Nierenschädigung wird in deutlich geringerem Ausmaß beobachtet. Im Folgenden werden die Lösungsansätze näher betrachtet.

### 2.1.3 Lipid-Komplex (ABLCL)

Die neuen liposomalen und lipidhaltigen Zubereitungen von Amphotericin B weisen eine verminderte Nephrotoxizität auf (Bekersky, 1999; Costa and Nucci, 2001; Hann and Prentice, 2001; Herbrecht, 1997). Amphotericin B-Lipid-Komplex (ABLCL, Abelcet<sup>®</sup>) wurde 1995 als erste Lipidformulierung von der FDA zugelassen (Robinson and Nahata, 1999). ABLCL besteht aus einem Komplex von Amphotericin B mit zwei Phospholipiden in einem Arzneistoff-Lipid-Verhältnis von 1:1. Die zwei Phospholipide Dimyristolphosphatidylcholin und Dimyristolphosphatidylglycerol liegen in einem molaren Verhältnis von 7:3 vor. Als Ursprung dieser Rezeptur diente eine von Lopez-Berestein entwickelte liposomale Formulierung (Lopez-Berestein et al., 1983; Mehta, 1997). Der molare prozentuale Anteil von Amphotericin B konnte von 2-7% auf 33% erhöht werden. Die räumliche Konfiguration des stabilen Arzneistoff-Phospholipid-Komplexes ist bandförmig mit einer Größe von 1-10 µm (Bekersky, 1999). ABLCL ist in Deutschland nicht zugelassen und wird in den USA von der Liposome Company (Princeton, NJ, USA) hergestellt. Das Produkt wird als sterile 5 mg/mL Suspension geliefert und muss unter Lichtausschluss und Kühlung gelagert werden. Vor Infusion wird mit 5%iger Dextroselösung auf eine Endkonzentration von 1-2 mg/mL verdünnt. Die Dextrosezubereitung kann 48 h lang bei 2-8 °C gelagert werden und zusätzlich 6 h bei Raumtemperatur (The Liposome Company, 2000).

Die Amphotericin B-Konzentration im Blut ist nach Applikation von ABLC niedriger als nach Gabe von Amphotericin B-Desoxycholat. Allerdings findet sich eine höhere Konzentration von ABLC in Lunge, Leber und Milz. Durch schnelle Aufnahme in das MPS (Retikuloendotheliales System, heute als MPS bezeichnet) erfolgt eine geringe Konzentration an zirkulierendem Amphotericin B. Die Konzentration in den Nieren ist leicht gesenkt, was mit der beobachteten Reduzierung der Nephrotoxizität korreliert (Wong-Beringer et al., 1998). Erst im infizierten Gewebe wird das verkapselte Amphotericin B durch Lipasen, die unter anderem von der Pilzzelle selbst gebildet werden, freigesetzt (Bekersky, 1999). ABLC wird üblicherweise in einer Dosis von 5 mg/kg verabreicht. Höhere Dosierungen bis 7 mg/mL bzw. die 10fache Menge des konventionellen Amphotericin B konnten sicher verabreicht werden (Janoff et al., 1993). Die Nephrotoxizität von ABLC ist gegenüber konventionellem Amphotericin B bei gleich bleibender Effektivität geringer (Anaissie et al., 1995; Hiemenz and Walsh, 1996; Janknegt et al., 1992; Wong-Beringer et al., 1998). Die Häufigkeit von infusionsbedingten Nebenwirkungen wird, verglichen mit der konventioneller Therapie, mit gleich bleibend (Hiemenz and Walsh, 1996; Wong-Beringer et al., 1998) oder verringert (Anaissie et al., 1995; The Liposome Company, 2000) beschrieben. Abelcet<sup>®</sup> wurde als Mittel der zweiten Wahl eingestuft, das angewendet werden darf nach einem Therapieversagen mit Fungizone<sup>®</sup> oder der Gefahr eines Therapieabbruchs aufgrund der Nebenwirkungen.

#### **2.1.4 Amphotericin B als kolloidale Dispersion (ABCD)**

Die Zulassung erfolgte von der FDA im November 1996 als Second-Line-Therapeutikum bei invasiver Aspergillose (Robinson and Nahata, 1999; Wong-Beringer et al., 1998). Amphotericin B als „Colloidal Dispersion“ stellt eine äquimolare Mischung von Amphotericin B und Cholesterylsulfat dar. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Toxizität Amphotericin B-haltiger Liposomen mit variierender Zusammensetzung ändert. Unter Sterolhaltigen Liposomen stellten sich Cholesterolsulfat-haltige Liposomen als besonders günstig dar (Bekersky, 1999). Mit der Zunahme der Amphotericin B-Konzentration lagern sie sich in wässriger Lösung zu scheibenartigen, nicht liposomalen Strukturen um, die in Amphotec<sup>®</sup> einen Durchmesser von 120 nm und eine Dicke von 4 nm haben. Amphotec<sup>®</sup>, der zweite Handelsname lautet Amphocil<sup>®</sup>, ist in Deutschland nicht zugelassen und wird vom Hersteller Sequus Pharmaceuticals (Menlo Park, CA, USA) als steriles lyophilisiertes Pulver angeboten. Zur Rekonstitution wird pro 50 mg 10 mL Aqua ad injectabilia hinzugegeben und mit 5%iger Dextroselösung auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Eine Zubereitung von

0,1-2 mg/mL in Dextroslösung kann 14 Tage unter Lichtausschluss bei einer Temperatur von 4-23 °C gelagert werden. Sequus beschreibt lediglich eine Lagerzeit von 24 h bei 2-8 °C. Die gebräuchliche Dosierung beträgt 3-6 mg/kg. Dosierungen bis 7,5 mg/kg gelten als sicher (Arikan and Rex, 2001; Patterson and McGinis, 2003).

Amphotec<sup>®</sup> weist eine Zweikompartiment-Pharmakokinetik auf. Nach der Infusion wird das Produkt durch das Retikuloendotheliale System (RES) schnell aus dem Blut entfernt und anschließend erneut in die Zirkulation freigesetzt (Mykosen Online Redaktion, 2002a). Die Leber dient hier als Reservoir für den Arzneistoff. Verglichen mit Fungizone<sup>®</sup> liegen die maximalen Plasmakonzentrationen niedriger. Es werden hohe Konzentrationen in der Leber, in der Milz und im Knochenmark erreicht. Allerdings sind die Konzentrationen in der Niere, in der Lunge und im Herz vergleichbar mit konventionellem Amphotericin (Mehta, 1997). Die verfügbaren Daten weisen auf eine vergleichbare Effektivität mit Fungizone<sup>®</sup> hin, bei einer signifikant geringeren Nephrotoxizität um einen Faktor von 5-8. Stärker auftretende akute Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost und Kopfschmerzen führten zu einer Anwendungsbeschränkung auf einen Einsatz bei Therapieresistenz oder Unverträglichkeiten unter Fungizone<sup>®</sup> (Wong-Beringer et al., 1998).

### **2.1.5 Liposomales Amphotericin B (AmBisome<sup>®</sup>)**

Durch Einarbeitung von Arzneistoffen wie Chemotherapeutika und Antimykotika in Liposomen, konnten nachweislich auftretende Toxizitäten bei gleichem pharmakologischen Effekt reduziert werden (Arikan and Rex, 2001; Belazsovits et al., 1989; Lopez-Berestein et al., 1983; Perez-Soler et al., 1986). AmBisome<sup>®</sup> (Nexstar Pharmaceuticals, San Dimas, CA, USA) ist die einzige echte liposomale Amphotericin B-Zubereitung und wurde in Europa 1994 zugelassen. 1997 erhielt sie die Zulassung in den USA. AmBisome<sup>®</sup> ist derzeit angezeigt zur Therapie bei Patienten mit schweren invasiven Mykosen oder zur empirischen Behandlung von vermuteten Pilzinfektionen bei neutropenischen Patienten mit Fieber, bei denen konventionelles Amphotericin B auf Grund einer Nierenschädigung oder aus Unverträglichkeit kontraindiziert ist (Gilead, 2003). Der Hersteller in Deutschland, Gilead Science (Martensried), liefert eine Durchstechflasche, die 1,326 g Trockensubstanz enthält. Diese enthält 50 mg Amphotericin B. Die Liposomen bestehen aus hydriertem Sojaphosphatidylcholin, Cholesterin und Distearylphosphatidylglycerin in einem molaren Verhältnis von 10:5:4 (Mehta, 1997). Cholesterol dient hier zur Stabilisierung der liposomalen Membran. Das geladene Phosphatidylglycerol wurde eingeführt, um die

Amphotericin B-Liposomen durch ionische Wechselwirkungen zusätzlich zu stabilisieren. Weitere Stabilisierung resultiert aus der starken Amphotericin B-Cholesterol-Bindungsregion (Bekersky, 1999; Wong-Beringer et al., 1998). Aufgrund der destabilisierenden Eigenschaft des Arzneistoffs auf die Liposomenmembran musste der Arzneistoffgehalt mit 10 mol% gering gehalten werden (Janknegt et al., 1992).

AmBisome<sup>®</sup> wird mit 12 mL Wasser für Injektionszwecke rekonstituiert (4 mg/mL) und auf eine Endkonzentration von 0,2-2,0 mg/mL durch Verdünnen mit Glucoselösung eingestellt (Gilead, 2003). Dabei wird die Verwendung eines 5 µm Filters vorgeschrieben. Das Konzentrat kann bei 25 °C über 24 h und bis zu 7 Tage bei 2-8 °C gelagert werden. Für die verdünnte Lösung wird abhängig von der Konzentration der Glucoselösung und der Amphotericin B-Konzentration eine Haltbarkeit von 2-7 Tagen bei 2-8 °C und bei 25 °C von 24-72 h angegeben. Aus mikrobiologischer Sicht sollte aber eine Anwendung innerhalb von 24 h erfolgen.

Über AmBisome<sup>®</sup> wurden bisher die meisten Daten veröffentlicht. Es wird in Dosierungen von 3-5 mg/mL Körpergewicht eingesetzt. Erhöhung der Dosen auf 7,5-15 mg/kg wurden als sicher eingestuft (Walsh et al., 1998). Ein optimales Dosierungsregime konnte noch nicht erarbeitet werden. Im Vergleich zu Fungizone<sup>®</sup> zeigt die liposomale Zubereitung ebenfalls ein unterschiedliches pharmakokinetisches Verhalten. Die Unterschiede aller Lipidzubereitungen in der Pharmakokinetik kann möglicherweise die Ursache dafür sein, warum eine dem konventionellen Amphotericin B überlegene Wirksamkeit für keine der Lipidzubereitungen bei Dosen bis zu 5 mg/kg gesichert werden konnte. Die kleinen unilamellaren Liposomen der AmBisome<sup>®</sup>-Zubereitung mit einer Größe unter 100 nm sorgen dafür, dass die Verweilzeit im Blut erhöht ist. Im Vergleich mit den anderen Lipid-basierten Arzneiformen und Fungizone<sup>®</sup> ist daher ein höherer C<sub>max</sub>-Wert feststellbar (Bekersky, 1999). Trotz einer langsamen Clearance kommt es zu einer Anreicherung in MPS-assoziierten Geweben wie der Leber und der Milz, wobei die Konzentrationen in Niere und Lunge mit Fungizone<sup>®</sup> vergleichbar bleiben (Mehta, 1997).

Ebenso wie die anderen Amphotericin B-haltigen Präparate liegt eine Wirksamkeit in der Therapie von Aspergillosen, Candidosen und Kryptokokkosen vor.

Die Sicherheit von AmBisome<sup>®</sup> konnte in Studien gezeigt werden. Akute und infusionsbedingte Nebenwirkungen treten mit verminderter Häufigkeit auf (Bekersky, 1999; Hann and Prentice, 2001; Johansen and Gotzsche, 2000; Wong-Beringer et al., 1998). Ein Auftreten der Nephrotoxizität kann mit AmBisome<sup>®</sup> erheblich reduziert werden (Bekersky,

1999; Hann and Prentice, 2001; Walsh et al., 1998). Abhängig von der Definition und applizierten Dosis treten Fälle zwischen 0 und 31% auf (Wong-Beringer et al., 1998).

### **2.1.6 Mögliche Ursachen für einen erhöhten therapeutischen Index der lipidhaltigen Zubereitungen**

Der genaue Mechanismus, der hinter einer reduzierten Toxizität der lipidhaltigen Zubereitungen steht, der auch erhöhte Dosierungen zulässt, ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Allgemein anerkannt wird die These, dass lipidgebundenes Amphotericin B pharmakologisch inaktiv ist und zum Entfalten der Wirkung (und Nebenwirkung) aus dieser Bindung freigesetzt werden muss (Maesaki, 2002; Slain, 1999). Mehrere Erklärungsansätze für einen erhöhten therapeutischen Index werden von verschiedenen Autoren diskutiert:

1. Kurz nach dem Eintritt der Lipidzubereitungen in die systemische Zirkulation werden diese durch Makrophagen aufgenommen, Arzneistoff- und Lipidkonjugate getrennt und wieder der systemischen Zirkulation zugeführt. Da sich Makrophagen vermehrt am Infektionsherd befinden, kann somit eine gezielte Zufuhr zu infizierten Geweben erfolgen (Mehta et al., 1994). Zusätzlich dienen die phagozytierenden Zellen als Arzneistoffreservoir (Bekersky, 1999; Legrand et al., 1996; Mehta, 1997).
2. Im Falle von liposomalen Zubereitungen mit einer langen Zirkulationszeit im Blut kann ein selektiver Transport zu den Pilzzellen angenommen werden. Liposomen häufen sich am Infektionsherd, heften sich an die Pilzzelle und transferieren Amphotericin B direkt in die Pilzzelle (Arikan and Rex, 2001; Juliano et al., 1987; Wong-Beringer et al., 1998). Erklärungsansätze für diesen Vorgang liegen in der Affinität von Amphotericin B zu den verschiedenen Lipiden und Sterolen. Die Affinität zu den Lipidmembranen in den Liposomen scheint größer zu sein als zum Cholesterin in Säugerzelle, aber wiederum geringer als zum Ergosterin in den Pilzzellen (Maesaki, 2002; Slain, 1999).
3. Bei der Lipidzubereitung ABLC liegt die Vermutung nahe, dass extrazelluläre Phospholipasen, die von vielen Hefe- und Schimmelpilzen gebildet werden, am Infektionsherd für die Freisetzung des Arzneistoffs sorgen (Bekersky, 1999; Slain, 1999; Wong-Beringer et al., 1998).

4. Lipidzubereitungen verhindern die Freisetzung von Cytokinen, welche Toxizitätsreaktionen in Säugerzellen fördern können.
5. Eine weitere Toxizitätsminderung mag in der Plasmaproteinbindung von Amphotericin B liegen. Lipidgebundenes Amphotericin B bleibt vorwiegend an HDL gebunden. An HDL gebundenes Amphotericin B könnte weniger nierentoxisch wirken als freies oder an LDL gebundenes Amphotericin B (Fungizone<sup>®</sup>), da die Niere kaum HDL-Rezeptoren aufweist (Arikan and Rex, 2001; Maesaki, 2002; Wasan and Lopez, 1996; Wasan and Lopez, 1997).

Zusammenfassend wird Amphotericin B vermutlich selektiver zur Zielzelle transportiert, bei gleichzeitig reduzierter Aufnahme durch Säugerzellen. Der genaue Mechanismus, der hinter einer Reduzierung der Nierenschädigung steht, wird noch weiter untersucht werden müssen.

### **2.1.7 Kosten-Nutzenanalyse**

Nach wie vor ist es schwierig, Mykosen frühzeitig zu diagnostizieren und wirksam zu behandeln. Der Goldstandard liegt beim intravenös verabreichten Amphotericin B. Die bei der Therapie auftretenden Nebenwirkungen können, wie in Kapitel 2.1.6 dargelegt, durch Lipidzubereitungen reduziert werden. Hierbei hat AmBisome<sup>®</sup> eine bedeutende Rolle eingenommen. Bei einer Therapie muss individuell über den Einsatz eines bestimmten Produktes, über die Zusatzmedikation, die Infusionsdauer und die erforderliche Dosis entschieden werden. Leider bleibt hierbei eine Kosten-Nutzenanalyse der jeweiligen Therapie nicht aus. Sich an die Therapie anschließende Kosten, z.B. für eine Behandlung der irreversiblen Nierenschädigung, einen weiteren Krankenhausaufenthalt und Dialysen, bleiben schwer kalkulierbar, können aber erheblich sein. Auch die Leiden der Patienten könnten durch notwendige Folgebehandlungen vermehrt werden. Hinzu kommt, dass Mykosen noch immer schwer diagnostizierbar sind und daher häufig eine empirische Behandlung bei vermuteter Pilzinfektion nötig ist. Einige Pilzinfektionen widersetzen sich der Therapie und werden begleitet von Morbidität und Todesfällen. Die Tabelle 2-1 zeigt einen Vergleich der geschätzten Therapiekosten pro Tag der verschiedenen Amphotericin B-Formulierungen bei einem Durchschnittspatienten von 70 kg Körpergewicht (Lewis, 2003; Robinson and Nahata, 1999; Wong-Beringer et al., 1998).

**Tab. 2-1: Vergleich der täglichen Therapiekosten der verschiedenen Amphotericin B-Produkte für einen 70 kg schweren Patienten**

Formulierung	Produkt Preis	Dosierung	geschätzter Tagespreis bei einem KG von 70 kg
Fungizone <sup>®</sup>	\$13 pro 50 mg	0,5 mg/kg/d 1,0 mg/kg/d	\$9 \$18
Abelcet <sup>®</sup>	\$135 pro 50 mg \$230 pro 100 mg	5,0 mg/kg/d	\$805-\$945
Amphotec <sup>®</sup>	\$93 pro 50 mg \$160 pro 100 mg	4,0 mg/kg/d	\$448-\$521
AmBisome <sup>®</sup>	\$188 pro 50 mg	3,0 mg/kg/d 5,0 mg/kg/d 10,0 mg/kg/d	\$790 \$1317 \$2633

Die Tabelle 2-3 zeigt deutlich, dass eine Therapie mit Fungizone<sup>®</sup> die kostengünstigste Alternative darstellt. Allerdings wird diese Therapie von erheblichen Nebenwirkungen begleitet. Die Zulassung bei den Lipidzubereitungen beschränkt sich z.T. aus Kostengründen auf eine Second-Line-Therapie. Besonders die bedeutenden Vorteile des sehr teuren liposomalen Produkts AmBisome<sup>®</sup> werden aus Kostengründen zu wenig oder zu spät genutzt. Häufig sind lange Therapiezeiträume mit Amphotericin B zu überbrücken. Hier kommt oft nur der Einsatz von Lipidformulierungen in Frage, da sie höher dosiert werden können bei geringerer Toxizität. Da die Kosten häufig nicht vorausschauend richtig überblickt werden, scheint es gängige Praxis zu sein, eine Behandlung mit Fungizone<sup>®</sup> so lange wie möglich durchzuführen und erst bei Komplikationen zu einer Therapie mit AmBisome<sup>®</sup> zu wechseln. Die Studien, die sich mit den Gesamtkosten einer Therapie inklusive der Nachbehandlung der Nephrotoxizität beschäftigen, zeigen, dass kaum eine Kostendifferenz zwischen den Behandlungen mit den unterschiedlichen Lipidzubereitungen besteht. Durch einen längeren Krankenhausaufenthalt können die Kosten einer Fungizone<sup>®</sup>-Therapie die einer AmBisome<sup>®</sup>-Therapie deutlich überschreiten (Hann and Prentice, 2001).

Die obigen Ausführungen machen deutlich, dass eine große Nachfrage nach einer Amphotericin B-Formulierung besteht, die die gesamten Vorteile der Lipid-basierenden Produkte aufweist - bei gleich bleibender oder besserer Effektivität und erheblich günstigeren Therapiekosten.

### 2.1.8 Zumischung von Amphotericin B zu parenteralen Fettemulsionen

Die positive Bewertung der Lipid-Formulierungen, mit denen jedoch erhebliche primäre Therapiekosten verbunden sind, führte zu Zumischungsversuchen mit konventionellem Amphotericin B (Fungizone<sup>®</sup>). Dieses wurde mit handelsüblichen Fettemulsionen, die üblicherweise zur parenteralen Ernährung eingesetzt werden, verdünnt (Chavanet et al., 1997; Heinemann et al., 1997; Walker et al., 1998). Durch das Vorgehen versprach man sich eine gleichwertige Therapie, verbunden mit erheblicher Kostensenkung. Schwer lösliche Arzneistoffe, wie Diazepam und Etomidat, konnten so erfolgreich einer intravenösen Therapie zugänglich gemacht werden (Klang et al., 1998).

Verschiedene Zubereitungswege zur Einarbeitung von Amphotericin B in parenterale Fettemulsionen, wie z.B. Intralipid<sup>®</sup>, wurden bisher untersucht. Dabei wurde Amphotericin B entweder direkt in der Fettemulsion suspendiert (Caillot et al., 1994; Chavanet et al., 1997), in 5% Dextroselösung aufbereitet und anschließend mit der Fettemulsion vermischt (Heinemann et al., 1997; Schöffski et al., 1998; Shadkhan et al., 1997) oder es wurde vor einer Mischung mit der Fettemulsion nach Packungsbeilage zunächst mit Wasser für Injektionszwecke eine Stammlösung hergestellt (Nath et al., 1999; Walker et al., 1998). Einige Studien versäumen, Angaben über die Herstellung zu machen. Die Amphotericin B-Konzentrationen der Fettemulsionen variieren zwischen 0,02 und 2 mg/mL.

Die Beurteilung physikalischer und chemischer Betrachtungen sowie Untersuchungen der Toxikologie fallen sehr unterschiedlich aus. Die Beobachtungen stehen unmittelbar in Zusammenhang mit einer erfolgreichen oder nicht erfolgreichen Inkorporation des Arzneistoffs in die Emulsionen.

Am Tiermodell konnte eine gleich bleibende Effektivität bei verminderter Toxizität nachgewiesen werden, indem Amphotericin B mittels der „Solvent Evaporation“ Methode erfolgreich eingearbeitet wurde (Kirsh et al., 1988). Weitere Tier- und Patientenstudien unterstützen Beobachtungen zu erhöhter oder gleicher Effektivität, bei verminderter Toxizität (Caillot et al., 1994; Chavanet et al., 1992; Heinemann et al., 1997; Johansen and Gotzsche, 2000; Moreau et al., 1992). Zusätzlich wirkt sich die Gabe von höheren Dosen einer Amphotericin B-Emulsion positiv auf die Heilungsrate aus (Barquist et al., 1999; Shadkhan and Segal, 2001). Ein Hämolyse-Test bestätigte die reduzierte Toxizität beim Einsatz von Emulsionen. Bis zu einer Konzentration von 80 mg/L konnte keine Hämolyse roter Blutkörperchen beobachtet werden (Shadkhan et al., 1997). Bei Fungizone<sup>®</sup> hingegen zeichneten sich erste Reaktionen bei einer Konzentration von 0,1 mg/L ab; bei 4,5 mg/L

erfolgte komplette Hämolyse. Andere Studien berichten von vergleichbarer Sicherheit und Toxizität mit Fungizone<sup>®</sup> (Nath et al., 1999; Nucci et al., 1999; Schöffski et al., 1998). Konventionell behandelte Patienten erhielten in der Studie von Nucci und Mitarbeitern (1999) allerdings eine Prämedikation, die das Ergebnis forciert haben könnte. Die in der Arbeitsgruppe um Schöffski beobachtete Lungentoxizität wurde auf eine Fettüberladung bei der Kurzzeitinfusion zurückgeführt (250 mL/h).

Technologisch betrachtet stellen solche „hausgemachten“ Zubereitungen ein erhebliches Problem dar. Häufig wurde berichtet, dass Zumischungen nach wenigen Stunden Instabilitätsprobleme aufwiesen. Diese können sich in Aufrahmen der Emulsion oder in Präzipitation des Arzneistoffes äußern (Trissel, 1995; Washington et al., 1993). Fast 50% der Partikel in den 10 oder 20%igen Fettemulsionen waren größer als 10 µm, ein deutlich größerer Anteil als bei Fungizone<sup>®</sup> in Glucoselösung (Trissel, 1995). In diesen Fällen kann vermutet werden, dass Amphotericin B nicht in die Lipidphase aufgenommen wurde, sondern als Partikel neben den Öltröpfchen oder adsorbiert an der Oberfläche vorlagen. Andererseits wurden bisher keine Emboliefälle während einer Amphotericin B-Emulsionsinfusion registriert (Sievers et al., 1996). Aus diesen Beobachtungen heraus muss die Anwendung solcher Emulsionsformulierungen als nicht sicher eingestuft werden. Das milchige Erscheinungsbild der Fettemulsionen macht ein Erkennen solcher Präzipitate ohne weitere Hilfsmittel unmöglich. Mittlerweile distanzieren sich auch Hersteller parenteraler Fettemulsionen von diesen Mischungen. Eine Filtration der Zumischung würde zu einem Entfernen des aktiven Bestandteils führen.

Einige Autoren stellen sich diesem erkannten Problem. Sie konnten zeigen, dass diese physikalischen Instabilitäten stark von der Herstellungstechnik abhängig sind. Shadkhan et al. (1997) stellten Emulsionen durch Zumischen von Fungizone<sup>®</sup> in Dextroselösung zu 10 und 20%igen Fettemulsionen durch Schütteln her. 1minütiges Schütteln führte nach 24 h zur Trennung der Phasen, 18stündiges starkes Schütteln bei 2800 U/min zeigte keine Instabilität. Diese Beobachtung wurde durch Partikelgrößenmessung unterstützt. Gegenüber den Ausgangsemulsionen wurde keine Veränderung wahrgenommen. Untersuchungen des freien Anteils an Amphotericin B in den Zumischungen durch Ultrazentrifugation ergab einen Anteil von 60% bei den kurz geschüttelten Emulsionen und einen deutlich geringeren Teil von 10% bei den 18 h geschüttelten Emulsionen (siehe auch Kap. 4.8.1). Eine Stabilität über einen Monat konnte mit diesen Emulsionen, gelagert bei Raumtemperatur oder 4 °C, belegt werden. Folglich scheint eine physikalische Instabilität stark vom freien Amphotericin B-Anteil in den Emulsionen abhängig zu sein. Shadkhan und Segal (Shadkhan and Segal,

2001) konnten mit den Emulsionen, die sie durch 18 stündiges Schütteln herstellten, eine erhöhte Effektivität im Tierversuch verglichen mit Fungizone<sup>®</sup> nachweisen. Höhere Dosen mit 2 mg/kg/d stellten sich als effektiver als geringe Dosen heraus (0,4/mg/d). Die Überlebensrate variierte zwischen 30 und 100% im Vergleich zur Fungizone<sup>®</sup>-Therapie, bei der eine Überlebensrate von 13-65% verzeichnet wurde. Die Ergebnisse waren abhängig vom Schweregrad der Infektion und der eingesetzten Dosierung.

Zusätzlich scheint die Gesamtfettkonzentration einen Einfluss auf die Stabilität zu haben (Walker et al., 1998). Betrug der Volumenanteil an Intralipid<sup>®</sup> weniger als 30 mL/100 mL der Zubereitung mit einer Amphotericin B-Konzentration von 0,6 und 1,2 mg/mL, so wurden keine Präzipitate beobachtet.

Weitere Herstellungstechniken befassen sich mit der Möglichkeit, lipophile Bestandteile und den Arzneistoff zunächst in organischen Lösungsmitteln, wie DMSO oder Methanol, zu lösen und durch Einarbeiten in eine wässrige Phase eine Emulsion zu erhalten (Egito, 2002; Egito et al., 1996; Marzzullo et al., 1997). Dieser Ansatz erweist sich als wenig benutzer- und patientenfreundlich. Aus diesen Zubereitungen müssen die organischen Lösemittel entfernt werden. Das Entfernen erweist sich häufig als schwierig und kostenintensiv. Solche Untersuchungen tragen aber entscheidend zur Aufklärung systematischer Fragestellungen bei.

Über das pharmakokinetische Verhalten gibt es bisher kaum Untersuchungen. Es scheint gewisse Parallelen zur liposomalen Zubereitung zu geben. Wie bei AmBisome<sup>®</sup> wurde verstärkt eine Anreicherung in Leber und Milz, aber geringere Konzentrationen in Niere und Lunge nachgewiesen (Shadkhan et al., 2003).

Der Mechanismus, der eine geringere Toxizität erklärt, beruht bisher auf Spekulationen. Das Auftreten geringerer  $C_{max}$ - und AUC-Werte (Heinemann et al., 1997) kann genauso in Betracht kommen wie die Annahme, dass in den Formulierungen das membranschädigende Deoxycholat in den Emulsionen gebunden vorliegt. Der freie Anteil an Amphotericin B kann, wie oben erwähnt, ebenfalls durch Einlagerung in die Lecithinschicht der Emulsionstropfen reduziert werden und so zu einer besseren Verträglichkeit führen (Shadkhan et al., 1997).

Eine Beurteilung und einen Vergleich der bisher vorliegenden Studien gestaltet sich als schwierig, da bis heute nur eine geringe Anzahl an Studien veröffentlicht worden ist. Geringe Probandenzahlen, unterschiedliches Studiendesign, variierende Zubereitung der Amphotericin B-Emulsionen und eine breit gefächerte Dosierung, erschweren die Beurteilung. Die Studienlage macht allerdings Mut, weiter nach geeigneten Lipidzubereitungen zu suchen und Effektivität und Unbedenklichkeit nachzuweisen. Technologisch gesehen bleibt die

Einarbeitung von Amphotericin B in die Emulsionen eine Herausforderung, da die physikalisch und chemisch bedingten Instabilitäten beseitigt werden müssen, um eine sichere Applikation und ausreichend lange Lagerzeiten gewährleisten zu können. Gewisse Ansätze zur erfolgreichen Verarbeitung konnten bereits gezeigt werden (Shadkhan and Segal, 2001; Shadkhan et al., 1997).

Durch zukünftig fortschreitende Sparmassnahmen im Gesundheitswesen bei zunehmender Anzahl der systemischen Mykosen besteht ein großer Bedarf an preisgünstigen Alternativen zu den bisherigen Formulierungen. Eine einfache Anwendung des Arzneimittels ohne komplizierte Aufbereitungsschritte („ready-to-use“-Produkt) verbunden mit einer langen Haltbarkeit und hoher Sicherheit bei einer guten Wirkung, kommt allen Bedürfnissen aus dem Kreis der Industrie, der Ärzte und Patienten entgegen. An diesen Kriterien orientiert sich auch das Konzept dieser Arbeit für die Emulsionsentwicklung mit Amphotericin B.

## **2.2 Modellarzneistoff Xenon und Ansätze für eine parenterale Applikation**

Als weiterer Arzneistoff für eine potentielle systemische Gabe mit einer Emulsion als Arzneistoffträger wurde das Edelgas Xenon gewählt.

### **2.2.1 Xenon - ein Edelgas als Anästhetikum**

Xenon gehört in die Gruppe der Edelgase und wurde 1898 von Ramsey und Travers als Restsubstanz bei der Zerlegung von Luft entdeckt (Kennedy et al., 1992; Reyle-Hahn and Rossaint, 2000). Mit dem Edelgas Radon gehört Xenon zu den seltensten Edelgasen. Da es nur zu 0,0000089% in der Atmosphäre vorhanden ist, wird das Vorkommen von Xenon auf knapp 400 Mio. Tonnen geschätzt. Das entspricht einer Menge von 8 mL Xenon in einem Raum von 25 m<sup>2</sup> und 4 m Höhe (100 m<sup>3</sup>). Trotz der geringen Ressourcen ist Xenon für die Lampen-, Elektronik- und Laserindustrie, in der Raumfahrt, für die Kernforschung und vor allem in der Medizin, z.B. die Isotope bei der Computertomographie oder bei der Untersuchung der Durchblutung verschiedener Organe, von großem Interesse.

Das farblose, geruch- und geschmackslose Gas besitzt ein Molekulargewicht von 131. Somit ist es fünfmal schwerer als Luft und bildet mehrere stabile und instabile Isotope. Es ist flüssig bei -108 °C und gefriert unter -112 °C (Messer, 2000). Der Öl/Wasser-Löslichkeitskoeffizient

wird mit 20 angegeben. Aus der Gruppe der Edelgase ist es das einzige, das eine anästhetische Eigenschaft unter normobaren Bedingungen aufweist (Gäbler and Schmidt, 1999). Seine minimale alveoläre Konzentration (MAC) wird mit 71% angegeben (Dingley and Hughes, 2000). Auf seine starke hypnotische Potenz stießen Behnke und Yarborough im Jahre 1938 (Behnke and Yarborough, 1938). Erste Untersuchung an Mäusen mit 60-80% Xenon führten Lawrence et al. im Jahre 1946 durch (Lawrence et al., 1946). In den 50er Jahren wurde Xenon erstmals am Patienten erprobt (Cullen and Gross, 1951). Seitdem wird es nur vereinzelt in klinischen Versuchen zu Narkosezwecken eingesetzt. Xenon ist nicht brennbar und im Gasgemisch nicht explosiv. Daher ist es im Umgang als sehr sicher einzustufen (Dingley and Hughes, 2000). Der Blut/Gas-Verteilungskoeffizient liegt mit 0,14 deutlich niedriger als bei anderen Narkosegasen wie Lachgas (0,47) und Sevofluran (0,65). Daher weist es eine schnelle Einschlaf- und Aufwachcharakteristik mit leichter Steuerbarkeit auf (Boomsma et al., 1990; Dingley and Hughes, 2000; Gäbler and Schmidt, 1999; Lynch et al., 2000a; Reyle-Hahn and Rossaint, 2000).

Xenon wirkt als Antagonist des Glutamats am N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor und gehört somit zur Gruppe der NMDA-Rezeptor-Antagonisten (Dingley and Hughes, 2000; Franks et al., 1998; Lynch et al., 2000b; Reyle-Hahn and Rossaint, 2000; Weigt et al., 2003; Weigt et al., 2001). Petzelt et al. konnten nachweisen, dass Xenon in intrazelluläre Calcium-Regulationsvorgänge eingreift (Petzelt et al., 1999). An Zellkulturen zeigten sie, dass Xenon sowohl den extrazellulären Einstrom von Calcium Ionen in menschliche Endothelzellen als auch deren intrazelluläre Freisetzung selektiv und reversibel hemmt. Im Mechanismus der NMDA-Rezeptor-Hemmung liegt die hohe analgetische Potenz des Gases begründet, die andere Inhalationsnarkotika nicht aufweisen. Lachmann et al. verglichen die Effektivität und Potenz einer 70%igen Xenon-Inhalation mit einer 70%igen Lachgasinhalation (Lachmann et al., 1990). Der Opiatverbrauch in der Lachgasgruppe war fünfmal höher als in der Xenongruppe. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der Verbrauch von Fentanyl unter Xenon deutlich geringer ausfiel als in der Lachgasgruppe (Nakata et al., 2000). Die Schmerzhemmung bleibt noch Stunden nach dem Eingriff erhalten. Eine Überwachung der Atemfunktion, wie sie bei den üblichen Schmerzmitteln nötig ist, entfällt (Gefahr der Atemdepression durch Opiate). Zusätzlich kommt es zu einer verminderten Ausschüttung von Stresshormonen wie Adrenalin und Cortisol (Boomsma et al., 1990), so dass eine Xenon-Narkose den Patienten weniger belastet (Gäbler and Schmidt, 1999; Reyle-Hahn and Rossaint, 2000). Schon zwei Minuten nach Beendigung eines Eingriffs ist der Patient nebenwirkungsfrei und bei vollem Bewusstsein. Eine randomisierte Multicenter-Studie mit

einem großen Probandenkollektiv bestätigte einen sicheren Anästhesieverlauf bei deutlich schnellerer Erholung der Patienten (Rossaint et al., 2003). Ein weiterer Vorteil einer Xenonanästhesie liegt im positiven kardiovaskulären Effekt, der sich z.B. durch ein stabiles Verhalten der Herzfrequenz und des Blutdrucks äußert (Boomsma et al., 1990; Cullen and Gross, 1951; Lachmann et al., 1990; Lynch et al., 2000b; Reyle-Hahn and Rossaint, 2000). Von anderen Anästhetika ist bekannt, dass sie Einfluss auf das myokardiale Gewebe durch Veränderung des zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenstroms nehmen (Rehmert et al., 1998; Weigt et al., 1998). Daher kann Xenon gerade auch bei kardial schwer vorbelasteten Patienten Anwendung finden. Zusätzlich konnten neuroprotektive Eigenschaften belegt werden ohne gleichzeitige Neurotoxizität (Ma et al., 2002). Für die Risikogruppe der Schwangeren bietet Xenon als Narkosegas weitere Sicherheit. Im Vergleich zu Lachgas scheint es innerhalb einer frühen Schwangerschaft im geringeren Ausmaß zu Organschäden und Missbildungen zu führen (Lane et al., 1980). Gewisse Einschränkungen im Patientenfeld weist das Gas jedoch wegen seiner hohen Dichte auf. Zu beachten ist, dass Xenon zu einer Beeinträchtigung der Lungenmechanik führen kann (Calzia et al., 1999; Dingley and Hughes, 2000; Reyle-Hahn and Rossaint, 2000). Daher sollte ein Einsatz bei Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen (Raucher, Asthmatiker) nicht erfolgen. Die Elimination von Xenon erfolgt ohne Umwandlung in Metaboliten hauptsächlich über die Lunge.

Als Anästhetikum erfüllt Xenon viele Kriterien eines idealen Narkosegases. Aus dem bisherigen Einsatz lassen sich zusammenfassend folgende Vorteile aufführen:

1. Die Narkose wird als sehr angenehm empfunden.
2. Xenon besitzt ein hohes anästhetisches und analgetisches Potential, eine schnelle Wirkung und gute Steuerbarkeit während einer Inhalationsnarkose. Innerhalb weniger Minuten nach Beendigung der Narkose ist der Patient nebenwirkungsfrei bei vollem Bewusstsein.
3. Es besteht eine hohe Kreislaufstabilität durch die fehlende Ausschüttung von Stresshormonen.
4. Xenon wird nicht metabolisiert.
5. Xenon besitzt eine hohe chemische Stabilität, ist nicht entflammbar, nicht explosiv, geht keine Reaktion mit OP-Materialien ein und weist keine Toxizitäten auf. Es ist einfach zu handhaben und zu lagern und stellt weiterhin keine Umwelt- und Arbeitsplatzbelastung dar.

Kein anderes zur Verfügung stehendes Mittel weist all die oben genannten Eigenschaften auf. Ein Hauptnachteil der anderen gasförmigen Narkosemittel sind die Nebenwirkungen auf Herz, Kreislauf oder andere Organsysteme, die häufig zu Komplikationen führen können und eine intensive Beobachtung erfordern. Zusätzlich stellt die Belastung der Umwelt (schädigende Effekte auf die Ozonschicht, Treibhauseffekt) und des Arbeitsplatzes ein weiteres Hauptproblem dar. Die Narkosegase werden durch undichte Gerätschaften und durch das Ausatmen durch Patienten in die OP-Raumluft freigesetzt. Chronisches Einatmen von Narkosegasen, wie es durch das OP-Personal erfolgt, führen zu einer erhöhten Anzahl von Fehlgeburten, Missgeburten und zu Häufung von Krebserkrankungen. Volatile Anästhetika und Lachgas werden weiter in den Hintergrund geraten. FCKWs (z.B. Enfluran, Isofluran) werden bis zum Jahr 2030 komplett verboten.

Angesichts der medizinischen Vorteile ist es verwunderlich, dass Xenon noch nicht verbreitet in den OP-Räumen eingesetzt wird. Die Begründung liegt im hohen Verbrauch und den enormen Herstellungskosten nach dem Linde-Verfahren durch Luftverflüssigung und anschließende fraktionierte Destillation (Georgieff et al., 1997). Ausserdem kann Xenon bisher nicht als Monoanästhetikum eingesetzt werden. Die Kosten für die aufwändige Xenongewinnung aus der Luft wurden 1999 in den USA mit 10,00 \$/L angegeben (Dingley and Hughes, 2000; Goto et al., 2003). Beim Einsatz in der Raumfahrt geht Xenon der Atmosphäre verloren und steht nicht mehr zur Rückgewinnung zur Verfügung (Gäbler and Schmidt, 1999). Bei steigendem Bedarf werden daher die Ressourcen noch knapper. Aus medizinischer Sicht war daher die Anwendung von Xenon mittels Low-Flow und Minimal-Flow-Geräten aus ökonomischen Gründen nicht akzeptabel (Baum, 1994; Baum, 1998). Erst die Entwicklung eines geschlossenen Systems auf Basis eines erprobten Anästhesiesystems und Recyclingtechnik brachte weitere Fortschritte, um den Verbrauch und die Kosten einer Xenonanästhesie weiter zu senken (Lynch et al., 2000b). Für eine zweistündige Narkose werden mit dieser Methode ungefähr 12 L Xenon benötigt (Air Liquide, 2004; Brunner, 1999). Die durchführbare Anzahl solcher Narkosen wird auf nur 400.000 pro Jahr weltweit geschätzt, würden die jährlich produzierten 6 Millionen Liter Xenon ausschließlich für anästhetische Zwecke genutzt (Lynch et al., 2000b). Für Anfang des Jahres 2005 wird eine Zulassung von Xenon von der Firma Air Liquide (Düsseldorf) für Deutschland erwartet. Russland vergab als erstes Land 1999 eine Zulassung (Dingley and Hughes, 2000).

Eine Einführung von Xenon hat weitere ökonomische Aspekte für das Gesundheitswesen (Reyle-Hahn and Rossaint, 2000). Durch das deutlich schnellere Erwachen nach einer Xenonanästhesie, auch nach langen Eingriffen, kann die teure intensiv-medizinische

Nachbetreuung entfallen. Durch die schnelle Orientierung und Selbstständigkeit der Patienten wird es möglich sein, auch den Kontroll- und Pflegebedarf im postoperativen Verlauf zu senken. Die analgetische Wirkung von Xenon wird weiterhin zu einer Reduzierung der postoperativen Schmerzbehandlung führen.

Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit und medizinischen Bedeutung von Xenon bleibt es interessant, die Kosten einer Xenonnarkose weiter zu senken. Eine zweistündige Inhalationsnarkose wird auf ca. 400-500 € geschätzt (Brunner, 1999). Andere Verfasser schätzen die Kosten inklusive Zusatzmedikation einer vierstündigen Narkose mit 16 L Xenon auf 170 \$, räumen allerdings ein, dass die Kosten wahrscheinlich zu gering geschätzt sind, da zusätzliche Kosten durch Reinigen und Spülen der Gerätschaften anfallen (Goto et al., 2003). Die Firma Air Liquide schätzt die Kosten allein für 12 L Xenon nach der Zulassung auf ca. 180-200 € (Air Liquide, 2004). Eine herkömmliche Narkose kostet ungefähr 85 €. An sie würde sich eine 24stündige Schmerztherapie in Höhe von 160 € anschließen (Brunner, 1999). In den USA werden die Kosten einer Lachgas- oder Isofluranbehandlung mit 30 \$ und 74 \$ berechnet (Goto et al., 2003).

Die Kopplung des Edelgases an eine Fettemulsion kann neue Dimensionen in die Betrachtung des Themas einbringen. Die Arbeitsgruppe um Georgieff konnte zeigen, dass nur noch 150 mL einer Xenon-Fettemulsion für eine zweistündige Narkose erforderlich sein können (Brunner, 1999; Georgieff et al., 2003; Georgieff et al., 1997). Xenon kann in einer 100fach geringeren Dosis appliziert werden. Die anfallenden Kosten könnten somit auf ca. 15 € für intravenöses Xenon gesenkt werden. Eine anschließende Schmerzbehandlung kann mit knapp 25 € berechnet werden (Brunner, 1999). In eine Fettemulsion inkorporiertes Xenon, zur Anwendung in der Anästhesie, ist ein ganz neues Forschungsgebiet. Die Arbeitsgruppe um Weigt (Weigt et al., 2003; Weigt et al., 2001) verglich die Wirkung von Xenon in Lipofundin<sup>®</sup> MCT 20% mit herkömmlichem Xenon auf Zellebene. Der inhibitorische Effekt stellte sich als gleichwertig heraus. Der Reaktionsmechanismus schien sich trotz Anwesenheit einer Fettemulsion nicht zu verändern (Weigt et al., 2003). In einem In-vivo-Modell konnte 1999 erfolgreich eine Magnetresonanzangiographie mit hyperpolarisiertem <sup>129</sup>Xe in Intralipid<sup>®</sup> 30 intravenös durchgeführt werden (Möller et al., 1999). In anderen Studien wurden die volatilen Anästhetika Isofluran (Eger and MacLeod, 1995) und Halothan (Musser et al., 1999) unter Einführung und Aufrechterhaltung der Anästhesie intravenös in einer Fettemulsion verabreicht. Die bisherigen Ergebnisse rechtfertigen und ermutigen zu weiterem Vorgehen im Bereich einer intravenösen Xenonapplikation.

Aus bisherigen Ansätzen kann davon ausgegangen werden, dass bei einer intravenösen Applikation die positiven Eigenschaften des Xenons erhalten bleiben. Dies konnte im Verlaufe dieser Arbeit auch bestätigt werden. Durch die schlechte Löslichkeit im Blut ist auch bei intravenöser Applikation ein schnelles An- und Abfluten ins Gehirn gewährleistet. Die analgetische Wirkung zeigt auch hier deutlich ihre Vorteile (Brunner, 1999). Xenon wird weiterhin nur über die Lunge eliminiert. Dadurch kann die Narkosetiefe gut gesteuert werden.

Die obigen Ausführungen demonstrieren, dass es sich lohnt, Entwicklungsarbeit in eine Emulsionsformulierung für das ideale Narkosemittel Xenon zu investieren. Besonders für Risikogruppen wie Schwangere, stillende Mütter, Kinder und herzkranken Patienten, stellt es eine Ergänzung zu den bisherigen Narkotika dar. Aus ökonomischer und ökologischer Sicht ist eine parenterale Xenongabe eine ideale Applikationsform. Somit können auch Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen von der Narkose mit Xenon profitieren. Die in dieser Arbeit entwickelten Xenon-Emulsionen verbinden „Neues“ mit „Altbewährtem“. Neu ist der Arzneistoff Xenon, obwohl er schon lange bekannt ist. Seit Jahren bewährt hat sich die Arzneiform der Emulsion, besonders im Einsatz in der parenteralen Ernährung und als Arzneistoffträger für Propofol, Etomidat und Diazepam.

## **2.3 Modellarzneistoff Omeprazol**

Als dritter Arzneistoff wurde Omeprazol gewählt, um zu prüfen, ob auch hier eine Verarbeitung in eine Fettemulsion mögliche Ansätze bietet, um Omeprazol zu stabilisieren und einer parenteralen Applikation zugänglich zu machen.

### **2.3.1 Eigenschaften und Überlegungen zur systemischen Aufbereitung**

Omeprazol gehört wie Lansoprazol, Pantoprazol, Rabeprazol und Esomeprazol zu den Protonenpumpenhemmern. Durch Blockade der Protonenpumpe ( $H^+/K^+$ -ATPase) kann die stärkste Unterdrückung der Säureproduktion bei peptischen Erkrankungen erreicht werden (Boothe, 2001; Mutschler et al., 2001). Der Einsatz von Omeprazol erfolgt bei Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren. Weitere Anwendungsgebiete sind Refluxösophagitis und das Zollinger-Ellison-Syndrom. Omeprazol ist die Standardsubstanz bei der Triple-Therapie zur vollständigen Entfernung des *Helicobacter pylori*. Ebenfalls eignet es sich zur Vorbeugung eines Magengeschwürs, z.B. zur Prophylaxe von NSAR-Ulcera.

Omeprazol (LEK Pharmaceuticals, Slowenien) ist ein lipophiles substituiertes Benzimidazol mit einem Molekulargewicht von 346 und den  $pK_a$ -Werten 4,2 und 9,0 (Beck et al., 1982). Das weiße Pulver zeigt nur eine geringe Wasserlöslichkeit. Bei der freien Base liegt es bei 82,3 mg/L (SRC PhysProp Database Demo). Der chemo- und thermolabile Arzneistoff sollte in lichtundurchlässigen Behältnissen bei Raumtemperatur gelagert werden. Im sauren Medium oder bei Wärmebelastung zersetzt sich der Arzneistoff unter Verfärbung (Castro et al., 1999). Die orale Applikation erfolgt wegen der Instabilität im Sauren über säuregeschützte Kapseln (Boothe, 2001). Die Stabilität ist stark vom pH-Wert abhängig. Im leicht alkalischen Bereich ist Omeprazol am stabilsten (pH ~11), bei einer Halbwertszeit von ca. 17 h. Unter einem pH von 7,8 zerfällt es sehr schnell (Mathew et al., 1995). Bei einem pH von 1 im Magensaft beträgt die Halbwertszeit nur ca. 2 min (Wallmark, 1986). Omeprazol steht sowohl als Tablette als auch als Infusionszubereitung zur Verfügung.

Der Arzneistoff ist eine inaktive Vorstufe, die im sauren Milieu (pH-Wert < 4) in den aktiven Wirkstoff umgewandelt wird (Forth et al., 1996; Mutschler et al., 2001). Je saurer das Milieu ist, desto stärker reichert sich Omeprazol am Wirkort an. Über eine Spiroverbindung als Zwischenstufe erfolgt die Umwandlung in die Sulfensäure. Unter Wasserabspaltung entsteht

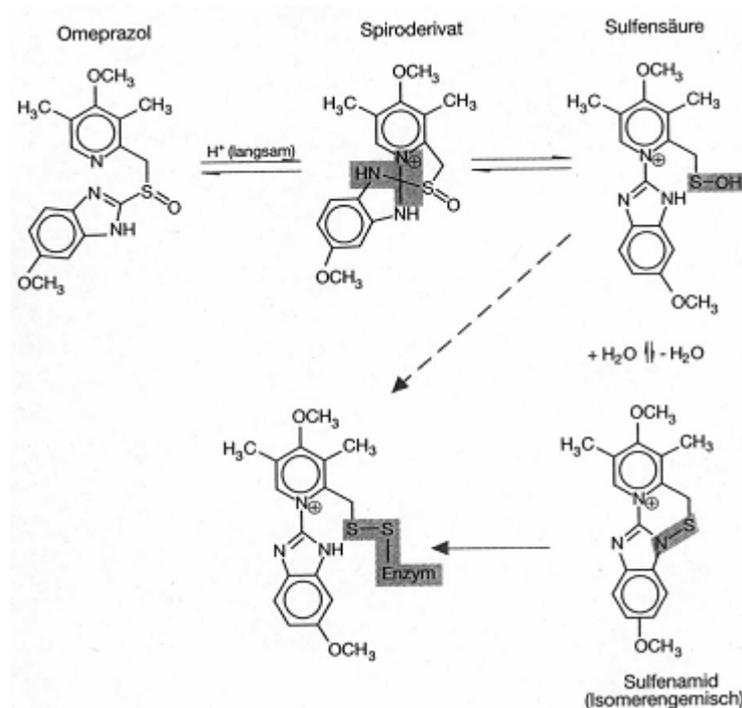


Abb. 2-3: Bioaktivierung von Omeprazol und Bindung an die  $H^+/K^+$ -ATPase (Mutschler et al., 2001)

das zyklische Sulfenamid, der eigentliche wirksame Metabolit. Sulfenamid reagiert mit der  $\alpha$ -Einheit der  $H^+/K^+$ -ATPase. Es entsteht eine Disulfidbrücke und das Enzym wird irreversibel blockiert. Die Reaktion ist in Abbildung 2-3 wiedergegeben. Eine Enzymregeneration ist nur über Neubildung möglich. Daher ist trotz einer kurzen Halbwertszeit eine Wirkung über 1-3 Tage möglich. Die Umwandlung soll erst am Wirkort, den Belegzellen des Magens, erfolgen. Daher müssen Tabletten mit einem magenresistenten Überzug versehen sein. Nach der Resorption im Dünndarm gelangt Omeprazol in die Belegzellen.

Bei einer Omeprazol-Infusion kann es verstärkt zu Nebenwirkungen kommen. Daher sollte prinzipiell immer den Tabletten der Vorzug gegeben werden. Die Dosierung beträgt zwischen 20 und 40 mg. Die orale Bioverfügbarkeit steigt von 35% nach mehrmaliger Einnahme oder höheren Dosen auf 60%. Die Proteinbindung wird mit ungefähr 90% angegeben (AstraZeneca, 2003). Überschüssiger Wirkstoff wird in der Leber zu Hydroxyl-Derivaten und Sulfonen metabolisiert und renal ausgeschieden. Als Nebenwirkungen können gastro-intestinale Störungen, Müdigkeit, Kopfschmerzen und Hautveränderungen auftreten.

Parenterales Omeprazol wird z.B. von der Firma AstraZeneca unter dem Handelsnamen Antra<sup>®</sup> pro infusione in einer Durchstechflasche als Trockensubstanz mit Omeprazol-Natrium (entsp. 40 mg Omeprazol) geliefert. Zusätzlich sind Natriumedetat und Natriumhydroxid enthalten (AstraZeneca, 2003). Die Trockensubstanz wird vor der Anwendung in der Infusionsflüssigkeit gelöst. Hierzu darf ausschließlich physiologische Kochsalzlösung oder 5%ige Dextroselösung verwendet werden. Innerhalb von 6-12 Stunden muss die Lösung verbraucht werden.

Das Ziel einiger Arbeiten über Omeprazol besteht in dem Bestreben, Omeprazol in gelöster Form zu stabilisieren. Ekpe und Jacobsen fanden einen Zusammenhang zwischen der Protonen- und Salzkonzentration (Ekpe and Jacobsen, 1999). Quercia et al. konnten die Stabilität einer wässrigen Zubereitung auf 14 Tage verlängern, indem sie Omeprazol in einer 8,4%igen Natriumbicarbonat-Lösung lösten (Quercia et al., 1997). Eine Verminderung der Lagerungstemperatur von 24 °C auf 5 °C oder -20 °C verlängerte die Haltbarkeit der 2 mg/mL Lösungen auf 30 Tage ohne nennenswerte pH-Verschiebung.

Die Instabilität des Arzneistoffs erfordert bisher weiterhin die aufwändige Herstellung einer Trockensubstanz, die durch Fachkräfte vor einer Anwendung sachgerecht aufbereitet werden muss. Wesentlich praktikabler und sicherer im Umgang sind Arzneimittel, die ohne weiteres Zutun aus der Verpackung genommen und appliziert werden können. Eine Infusion oder Injektion ist gerade bei den Patienten nötig, die keine Arzneimittel peroral aufnehmen

können, aber dieser Therapie bedürfen, wie z.B. bei Patienten auf der Intensivstation, Patienten mit Magensonden oder Kleinkindern. Intravenöses Omeprazol ist effektiver und kostengünstiger als intravenöse H<sub>2</sub>-Antihistaminika oder Sucralfat (Phillips et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Einarbeitung von Omeprazol in eine Fettemulsion den Arzneistoff vor Zersetzung zu schützen vermag, womit in Zukunft ein fertig anwendbares Produkt zur Verfügung stünde.

## 2.4 Tenside

Einen entscheidenden Einfluss auf die Partikelverteilung und auf die Stabilität der Formulierungen hat die Auswahl der Tenside. Instabilität kann sich durch Sedimentation (Aufrahmen der lipophilen Phase in O/W-Emulsionen), durch Tropfenaggregation (Traubenbildung) oder durch Tropfenkoaleszenz (Zusammenfließen der Tropfen), die schließlich zur Separation der Phasen (Brechen der Emulsion) führen kann, äußern. Bei Nanosuspensionen spielen eher Aggregation (die Individualität der Teilchen bleibt erhalten), Agglomeration (Verlust der Individualität), Sedimentation und Kristallwachstum (*Ostwald-Reifung*) eine Rolle.

Zwei Hauptkonzepte der Stabilisierung treten in den Vordergrund, zum einen die elektrostatische Stabilisierung (Müller and Heinemann, 1993) und zum anderen das Konzept der sterischen Stabilisierung (Duro et al., 1998).

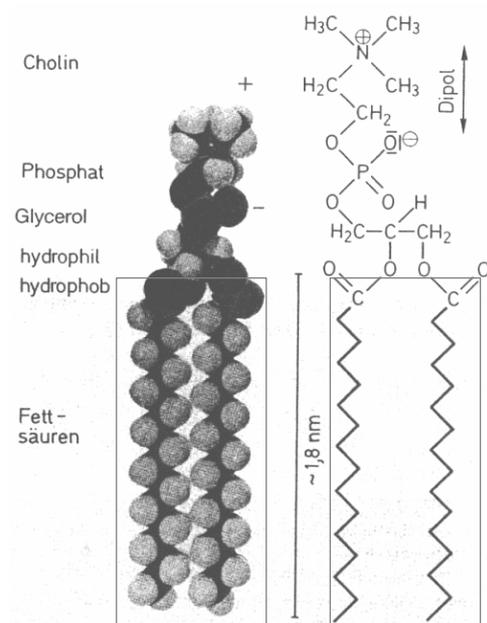
Bei der elektrostatischen Stabilisierung treten Abstoßungserscheinungen durch gleichsinnige Oberflächenladung der Partikel auf. Eine Charakterisierungsgröße stellt hier das Zetapotential dar (näheres in Kap. 3.2.3).

Mit dem Begriff der sterischen Stabilisierung wird eine Stabilisierung kolloidaler Systeme durch Moleküle mit großen hydrophilen Bereichen beschrieben. Hier sei die Gruppe der Poloxamere und Polysorbate genannt, die frei bewegliche Polyethylenoxidketten besitzen. Diese hydrophilen Bereiche der Moleküle reichen weit ins wässrige Dispersionsmedium hinein. Bei einer Annäherung der Partikel ist aus sterischen Gründen ein direkter Kontakt nicht möglich. Die Ketten können sich aber durchdringen und damit den Ordnungszustand im System erhöhen. Dies führt zu einem Entropieverlust, was thermodynamisch ungünstig ist. Bei Überlappung der Polyethylenoxidketten entsteht ein osmotisches Gefälle zwischen freier Wasserphase und wasserverarmten, Polyethylenketten-reichen Raum, den das Wasser zu

verdünnen versucht (Enthalpieeffekt). Die Abstoßung der Partikel erfolgt somit durch osmotischen Druck.

### 2.4.1 Lecithin

Als Lecithin werden Fettbegleitstoffe bezeichnet, die in allen tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Organismen vorkommen (Nasner and Kraus, 1982; Singer and Kramer, 1989). Sie sind wichtige Bestandteile der Zellmembran. Durch ihre hydrophilen und lipophilen Gruppen im Molekül sind Lecithine ideale Bausteine für die Doppellipidschicht. Lecithin gehört zu der Gruppe der Phospholipide (Hunnus Pharmazeutisches Wörterbuch, 1992): Ein Glycerolmolekül ist esterartig mit zwei, in der Regel verschiedenen Fettsäuren verbunden. Die dritte Hydroxylgruppe des Glycerolmoleküls ist mit Phosphorsäure verestert, an die Cholin (Phosphatidylcholin = PC), Ethanolamin (Phosphatidylethanolamin = PE), Serin, Inositol oder Glycerol verestert sein kann. Vereinfacht wird PC häufig als Lecithin bezeichnet. Lecithin liegt als Zwitterion vor (Abbildung 2-4).



**Abb. 2-4:**

**Schematische Abbildung von Phosphatidylcholin. Das Molekül hat eine dipolartige Struktur mit hydrophilem Kopf und längerer hydrophober Kohlenwasserstoffkette (Karlson, 1994).**

Lecithin ist ein Gemisch aus polaren Lipiden (Phospho- und Glykolipide) und unpolaren Lipiden (Neutrallipide, Nasner and Kraus, 1982). Die einzelnen Lecithine unterscheiden sich z.T. stark voneinander in der Phospholipid- und Fettsäurezusammensetzung (Sättigungsgrad und Kettenlänge, meist zwischen C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub>) und der Art ihrer Begleitstoffe (Parnham and Wendel, 1992). Besonders groß ist der Unterschied in der Fettsäurezusammensetzung

zwischen pflanzlicher (Soja-, Raps-, Erdnuß-, Weizenkeim-lecithin) und tierischer (Eilecithin) Herkunft. Pharmazeutisch angewendet werden hauptsächlich Soja- und Eilecithin. Durch Aufarbeitung, Fraktionierung und gegebenenfalls chemische Modifizierung der Sojabohne bzw. des Eigelbs entstehen Lecithine unterschiedlichster Zusammensetzung und variierenden Reinheitsgrades.

Die Zusammensetzung des Lecithins ist von besonderer Bedeutung für die Stabilität der Emulsionen. Mit 80% liegt der Hauptbestandteil bei dem Phospholipid Phosphatidylcholin, einem Zwitterion, das nach außen über einen weiten pH-Bereich neutral ist, und mit 10% bei dem Phospholipid Phosphatidylethanolamin, welches bei pH 7 nach außen neutral geladen ist. Insbesondere der geringere Anteil an Phospholipiden, der bei dem pH-Bereich der Emulsionen ionisch vorliegt, trägt über das Zetapotential zur Stabilisierung bei (Davis, 1982). Der Anteil der negativ geladenen Fraktion, Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol, ist mit 1-2% sehr gering. Lecithin findet ein weites Anwendungsgebiet in der Pharmazie. Da es den GRAS-Status besitzt, kann es bedenkenlos z.B. als Emulgator in parenteralen Fettemulsionen (z.B. Lipofundin<sup>®</sup>, Intralipid<sup>®</sup>) oder anderen injizierbaren Arzneimitteln (z.B. Propofol<sup>®</sup> Lipuro, Etomidat<sup>®</sup> Lipuro) eingesetzt werden (RoteListe<sup>®</sup>, 2003). Lecithin ist in Wasser dispergierbar, aber nicht löslich. Der amphiphile Emulgator gilt als sehr sichere, untoxische Komponente und wird durch den Körper durch Phospholipasen abgebaut (Parnham and Wendel, 1992). Eventuell auftretende toxische Reaktionen sind auf das bei langer Lagerung oder thermischer Belastung entstehende Lysolecithin zurückzuführen (Parnham and Wendel, 1992). Dieses wirkt hämolytisch und membranschädigend. Nachteilige Wirkungen sind erst ab einer Gesamtkonzentration von 30% zu erwarten.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Eilecithin wurde von der Firma B.Braun Melsungen (D-Melsungen) zur Verfügung gestellt. Alle weiteren natürlichen und synthetischen oder veränderten Phospholipide (Lecithine) stammen von der Firma Lipoid GmbH und werden in den einzelnen Kapiteln bezüglich ihrer Zusammensetzung näher erläutert.

#### **2.4.2 Tween<sup>®</sup> 80**

Polysorbat 80 (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat) wird unter dem Handelsnamen Tween<sup>®</sup> 80 geführt und wurde von der Firma Sigma Aldrich GmbH (D-Deisenhofen) bezogen. Dabei handelt es sich um ein O/W-Tensid mit einem HLB-Wert von 15. Es ist ein nichtionischer, sterischer Emulgator und Lösungsvermittler mit einer sehr geringen Toxizität (Fiedler, 1996). Tween<sup>®</sup> 80 findet breite Verwendung in zahlreichen oralen (z.B. Adalat<sup>®</sup>),

pulmonalen (z.B. Aerosol Spitzner<sup>®</sup>N) und parenteralen (z.B. Cordarex<sup>®</sup>, Multibionta<sup>®</sup>) Produkten (RoteListe<sup>®</sup>, 2003).

## 2.5 Parenterale Fettemulsionen

Vorwiegend wurden die parenteralen Emulsionen Lipofundin<sup>®</sup> MCT 10% und 20% N, Abbolipid<sup>®</sup> 10% und 20% und Lipovenös<sup>®</sup> MCT 20% verwendet. Deren Zusammensetzung und Hersteller können der Tabelle 2-2 entnommen werden.

Alle anderen Fettemulsionen wurden verwendet, wie sie von den jeweiligen Herstellern vertrieben wurden. Auf die Zusammensetzung wird in den jeweiligen Kapiteln eingegangen.

**Tab. 2-2: Zusammensetzung und Hersteller der am häufigsten eingesetzten Fettemulsionen**

Produktname	Ölphase	Fettgehalt [%]	Eilecithin [%]	Hersteller/Lieferant
Lipofundin <sup>®</sup> MCT 10%	LCT/MCT (1:1)	10	0,8	B. Braun Melsungen AG (D-Melsungen)
Lipofundin <sup>®</sup> 20% N	LCT	20	1,2	B. Braun Melsungen AG (D-Melsungen)
Abbolipid <sup>®</sup> 10%	LCT/Distelöl (1:1)	10	0,74	Abbot GmbH (D-Wiesbaden)
Abbolipid <sup>®</sup> 20%	LCT/Distelöl (1:1)	20	1,2	Abbot GmbH (D-Wiesbaden)
Lipovenös <sup>®</sup> MCT 20	LCT/MCT (1:1)	20	1,2	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (D-Bad Homburg)

## 2.6 Sonstige Rohstoffe

Alle sonstigen Rohstoffe, die für Screenings eingesetzt wurden, entsprachen den Herstellerspezifikationen oder offiziellen Monographien. Sie sind in Tabelle 2-3a bis c aufgeführt.

Tab. 2-3a: Lipid/-ähnliche Rohstoffe, die für Screenings verwendet wurden

<b>Lipid/-ähnliche Substanz (Lösungsmittel bzw lipophiler Bestandteil der Emulsionen)</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>	<b>Beschreibung und Verwendung</b>
Baumwollsaatöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) C <sub>14</sub> -C <sub>18</sub> , haupts. Linolsäure
Benzylalkohol	Sigma Aldrich GmbH (D-Deisenhofen)	Farblose Flüssigkeit, Lösungsvermittler
Benzylbenzoat	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Kosolvenz in öligen Injektionspräparaten
Diacetylmonoglycerid	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Ölige Flüssigkeit
Distelöl (Saffloweröl)	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) C <sub>16</sub> -C <sub>20</sub> , hauptsächlich Linolsäure
Erdnussöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) der Kettenlänge C <sub>16</sub> -C <sub>24</sub> , hoher Gehalt an Ölsäure und Linolsäure
Ethyleoleat	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Ölige, leicht verdauliche u. resorbierbare Flüssigkeit, Lösemittel für injizierbare Substanzen
Fischöl (Marineöl, Omega-3)	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) der Kettenlänge C <sub>14</sub> -C <sub>22</sub> , besonders hoher Anteil an Omega-3-Fettsäuren (34%)
Isopropylmyristat	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Wachsähnlicher, öliger Ester
Isopropylpalmitat	Riedel-de-Haen Sigma Aldrich GmbH (D-Seelze)	Dünflüssiger, öliger Ester, in pflanzlichen Ölen und Fetten löslich, wirkt in flüssigen Emulsionen stabilisierend
Isopropylstearat	Cognis (D-Düsseldorf)	Flüssiger Ester, ähnliche Eigenschaften wie Isopropylpalmitat
Labrafil <sup>®</sup> (Oleoylmacrogol-6 glycerid)	Gatte Fosse GmbH (D-Weil)	Lösungsvermittler, Koemulgator, lipophile Phase in Emulsionen
Leinöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) der Kettenlänge C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> , besonders Ölsäure, Linolsäure, Hauptbestandteil: Linolensäure
Maiskeimöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) der Kettenlänge C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> , besonders Ölsäure und Linolsäure

Fortsetzung Tab. 2-3a:

<b>Lipid/-ähnliche Substanz (Lösungsmittel bzw lipophiler Bestandteil der Emulsionen)</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>	<b>Beschreibung und Verwendung</b>
Mandelöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) der Kettenlänge C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> , Hauptbestandteil: Linolsäure neben Öl- und Palmitinsäure
Miglyol <sup>®</sup> 812 (MCT)	BBraun Melsungen AG (D-Melsungen)	Flüssiges Triglycerid mit gesättigten Fettsäuren, C <sub>8</sub> -C <sub>12</sub> , Hauptbestandteil: Capryl- und Caprinsäure
MOD <sup>®</sup> (2-Octyldodecylmyristat)	Gatte Fosse GmbH (D-Weil)	Ölige Flüssigkeit, Ersatz für Mineralöl
Mohnöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> , Hauptbestandteil: Linolsäure neben Öl- und Palmitinsäure
Olivenöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und ungesättigt) C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> , hauptsächlich Ölsäure
Paraffin (dünnflüssig)	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Flüss. Mischung gereinigter, gesättigter Kohlenwasserstoffe
Plurol (Polyglycerol-6 dioleat)	Gatte Fosse GmbH (D-Weil)	Viskose Lösungsvermittler, HLB-Wert: 6, Azneistoffträger
Rizinusöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Besteht zu 80-92% aus Rizinolsäure
Sesamöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) der Kettenlänge C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> , hauptsächlich aus Öl- und Linolsäure
Sojaöl (LCT)	B.Braun Melsungen AG (D-Melsungen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) der Kettenlänge C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> , hauptsächlich aus Öl- und Linolsäure
Sonnenblumenöl	Henry Lamotte GmbH (D-Bremen)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren (gesättigt und mehrfach ungesättigt) C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> , vorwiegend Linolsäure
Stearinsäure	Carl Roth GmbH (D-Karlsruhe)	Gesättigte Fettsäure, vielfache Anwendung in der Pharmazie

**Tab. 2-3b: Weitere Stabilisatoren, die für Screenings verwendet wurden**

<b>Stabilisatoren</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>	<b>Beschreibung und Verwendung</b>
Poloxamer 188	BASF (D-Ludwigshafen)	Block-Copolymer, HLB-Wert 29, breite pharmazeutische Anwendung, i.v. geeignet
Poloxamer 407	BASF (D-Ludwigshafen)	Block-Copolymer, breite pharmazeutische Anwendung

**Tab. 2-3c: Wässrige bzw polare Medien, die für Screenings verwendet wurden**

<b>wässrige/polare Medien</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>	<b>Beschreibung und Verwendung</b>
Glycerol 100%	B.Braun Melsungen AG (D-Melsungen)	Isotonisierungsmittel, Suspensionsmittel
Polyethylenglycol 400	Sigma Aldrich GmbH (D-Deisenhofen)	Viskose Flüssigkeit, Lösungsvermittler, auch parenteral einsetzbar
Polyethylenglycol 600	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Viskose Flüssigkeit, Lösungsvermittler, auch parenteral einsetzbar
Ethanol	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Lösungsmittel
Methanol	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Lösungsmittel
2-Propanol	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Lösungsmittel
n-Propanol	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Lösungsmittel
Propylenglycol	Sigma Aldrich GmbH (D-Deisenhofen)	Lösungsmittel, auch parenteral
Wasser	Millipore (D-Schwalmach)	Hergestellt durch Umkerosemose und anschließende Aufreinigung in einer MilliQ plus-Anlage, entspricht Arzneibuchmonographie „Aqua purificata“

Weitere Materialien, die für Analytikverfahren verwendet wurden, sind im Anhang (Kap. 10.2) zu finden.