

Aus der Augenklinik (Direktor: Prof. Dr. A. Kahán),  
dem Mikrobiologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. Ilona Béládi)  
und dem Zentral-Forschungslaboratorium (Leiter: Doz. Dr. P. Kása)  
der Medizinischen Universität Szeged/Ungarn

## In-vitro- und in-vivo-Untersuchung der „spritzfertigen“ Injektionslösung eines neuen Oxytetracyclin-Komplexes

Von H. Hammer, I. L. Kahán, I. Béládi, G. Szepesy, R. Pusztai, I. Joó  
und E. Tari

Die therapeutische Applikation des 1948 entdeckten Chlortetracyclins war gefolgt von der Isolierung bzw. Synthese einer ganzen Reihe von Tetracyclinen. Eines davon ist das auch heute noch häufig gebrauchte, 1950 von FINLAY isolierte Oxytetracyclin (OTC). Das salzsaure Salz des OTC kommt gewöhnlich in Form von per os zu nehmenden Tabletten in den Handel. Nachdem das OTC eine amphotere Verbindung darstellt, geht es in Wasser in entsprechender Konzentration nur in stark saurem oder stark alkalischem Milieu in Lösung; daher wird seine parenterale Anwendung erst nach Umwandlung in irgendeines seiner Derivate, z. B. das Pyrrolidinomethyl (PMOTC)-Derivat, möglich.

Einige OTC-Verbindungen eignen sich auch zur Herstellung stabiler Lösungen (1), wobei dann die im Handel befindlichen Ampullen eine zur Verabreichung fertige Lösung enthalten können. Im folgenden berichten wir über unsere bei in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen mit einem selbstgefertigten Trishydroxymethylaminomethan-OTC-Komplex, einer „spritzfertigen“ Tri-OTC-Lösung, gemachten Erfahrungen. Im Tri-OTC verbindet sich ein Mol OTC mit sechs Molekülen des von uns auch bei den übrigen Tri-Tetracyclinen verwendeten (4) Komplexbildners, des Trishydroxymethylaminomethans (9).

### 1. Material und Methoden

#### 1.1. Die zur Messung der antibiotischen in-vitro- und in-vivo-Aktivität benutzten OTC-Lösungen

Zu den Stabilitätsuntersuchungen und in-vivo-Versuchen fanden die spritzfertige Lösung des Tri-OTC in der Konzentration von 50 mg/ml und das PMOTC in der Konzentration von 25 mg/ml - ausgedrückt in OTC · HCl - Verwendung. Die Tri-OTC-Lösung hatte ein pH von 7,8 bis 8,8 und die PMOTC-Lösung ein solches von 5,0. Die in Gewebekulturen vorgenommenen Toxizitätsprüfungen erfolgten mit der

originalen spritzfertigen Tri-OTC-Lösung (50 ml/mg) und der originalen PMOTC-Lösung (25 mg/ml) sowie mit wasserverdünnten Lösungen (10 mg/ml),

### 1.2. Stabilitätsuntersuchungen

Es wurde die Stabilität von neun zu verschiedenen Zeitpunkten aus kristallinem OTC · HCl bereiteten spritzfertigen Tri-OTC-Präparaten geprüft. Die Ampullen wurden 28 d bei 0 °C, 36 °C bzw. 58 °C bzw. drei Jahre bei Raumtemperatur gehalten, dann ihr OTC-Gehalt bei einem Absorptionsmaximum von 353 nm spektrofotometrisch ermittelt und die antibiotische Aktivität - bei Verwendung von *Staphylococcus aureus* 8537 NCTO-425 als Testorganismus - turbidimetrisch bestimmt. Festgestellt wurde auch das pH der bei verschiedenen Temperaturen gelagerten Lösungen.

Die Stabilität der bei 0 °C und der bei Raumtemperatur gehaltenen Tri-OTC-Lösungen wurde auch mit chromatografischen und bioautografischen Methoden unter Verwendung des Stammes *Staphylococcus aureus* 8537 NCTO-425 bzw. unter Benutzung zweier chromatografischer Systeme untersucht: 1. aufsteigende Chromatografie; mit Mc Ilvain'schem Puffer (pH = 3,5) durchtränktes Filtrierpapier Whatman No. 4; Lösungsmittel: Benzol-Nitromethan-Pyridin (10:20:3). 2. absteigende Chromatografie unter Benutzung von mit 0,1 M EDTA-Na<sub>2</sub> durchtränktem Papier Whatman No. 1; Lösungsmittel: n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5) (7).

### 1.3. Untersuchung der gewebeschädigenden Wirkung

#### 1.3.1. Toxizitätsuntersuchungen an zwei Gewebetypen

##### a) an primären Hühnerembryonen-Fibroblasten

In Petrischalen mit 60 mm Durchmesser wurden mit  $25 \times 10^6$  Zellen Einzellschicht-Kulturen bereitet, die Nährflüssigkeit nach 24 h entfernt und die Zellen mit 5 ml agarhaltiger Nährflüssigkeit überdeckt. Nach dem Erstarren der Agarflüssigkeit wurden darin Löcher von 5 mm Durchmesser gebohrt und diese mit 0,05 ml des Testmaterials beschiekt. Nach 24stündiger Inkubation bei 35 °C folgte die Untersuchung. Der Decknährboden war Gey'sche Flüssigkeit, die 1,35% Agar-Agar, 5% Kalbsserum, 5% 0,05 M Tris-Puffer (pH = 7,6), 0,25% Laktalbumin-Hydrolysat und 0,01% Neutralrot enthielt.

##### b) an HEp-Zellen

Im Falle der HEp-Zellen wurden mit  $10^5$  Zellen in 1 ml Nährflüssigkeit (Gey'sche Lösung mit 0,25% Laktalbumin-Hydrolysat- und 5% Kaninchenserum-Gehalt) Kulturen hergestellt, diesen 0,1 ml des zu testenden Materials zugesetzt, die Kulturen bei 35 °C gehalten und täglich mikroskopisch untersucht.

### 1.3.2. Untersuchung der gewebeschädigenden Wirkung in vivo

Die Untersuchung der gewebeschädigenden Wirkung in vivo erfolgte an 20 g schweren weißen Mäusen. Die Rückenhaut der Tiere wurde mit Bariumsulfidpaste enthaart; am folgenden Tage wurden 0,2 ml der 50 mg/ml Tri-OTC- bzw. 25 mg/ml PMOTC-Lösung subkutan injiziert. Die Wirkung der Verbindungen wurde 2 Wochen hindurch verfolgt.

### 1.4. Akute Toxizitätsuntersuchungen

Die akute Toxizität des Tri-OTC-Komplexes wurde mit der des PMOTC verglichen. Das PMOTC gelangte in der Konzentration von 25 mg/ml und der Tri-OTC-Komplex in der Konzentration von 50 mg/ml zur Anwendung. Die Lösungen wurden weißen Mäusen im Gewicht von 20 g iv. injiziert und die einzelnen Dosen - vom PMOTC 70-200 mg/ml, vom Tri-OTC 70-300 mg/ml, in den einzelnen Gruppen mit 40 mg/kg Unterschied angewandt - an je 10 Tieren getestet. Untersucht wurde auch die Wirkung des Lösungsmittels in einer der LD<sub>50</sub> bzw. dem Volumen des Tri-OTC-Komplexes entsprechenden Menge. Die Tiere wurden 21 d lang beobachtet.

### 1.5. Untersuchung der Antibiotikumwirkung in vitro

Zur Bestimmung des minimalen Hemmeffektes wurden turbidimetrische Messungen bei Verwendung verschiedener Mikroorganismen - *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* - vorgenommen. Die Stämme gehörten zur Sammlung des Mikrobiologischen Instituts der Medizinischen Universität Szeged. Das Verzeichnis der getesteten Stämme enthält Tabelle 1.

Der minimalen hemmenden Konzentration entsprach jene kleinste Konzentration, bei der die Trübung schon nicht mehr meßbar war.

### 1.6. Konzentrationsbestimmung in verschiedenen Organen

Zehn männliche Kaninchen erhielten in die marginale Ohrvene 20 mg/kg spritzfertige Tri-OTC-Komplexlösung injiziert. Nach 1, 2, 4, und 8 h wurden Blutproben entnommen, diese sofort zentrifugiert und der Antibiotikumgehalt noch am gleichen Tage mit der Agar-Diffusionsmethode unter Benutzung des Mikroorganismus *Staphylococcus aureus* 8537 NCTO 425 geprüft. Sechs Kaninchen wurden nach 24 h mittels Luftembolie getötet und aus je 5 g Lunge, Leber, Niere, M. gluteus sowie 1 g Milz nach der Methode von SCHACH von WITTENAU und DELAHUNT (8) das OTC extrahiert und der Antibiotikumgehalt ähnlich wie beim Serum mit der Agar-Diffusionsmethode ermittelt. Auf analoge Weise wurde auch der Antibiotikumgehalt im Blut und Gewebe von 4 Kaninchen nach iv. Verabreichung von PMOTC bestimmt.

**Tabelle 1:** Die antibiotische Aktivität von PMOTC, OTC und Tri-OTC in vitro

Die Bestimmungen wurden in je 6-9 Parallelversuchen durchgeführt

Mikroorganismen	minimaler Hemmeffekt ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			
	PMOTC	OTC	Tri-OTC	
Bac. cereus var. mycoides	ATCC 9634	0,24	0,20	0,18
	5P <sub>15</sub>	0,20	0,10	0,10
	116	0,47	0,35	0,30
	Ca <sub>10</sub>	0,45	0,40	0,35
	5P <sub>3</sub>	0,37	0,35	0,30
	114 a	0,65	0,46	0,56
	Ca <sub>82</sub>	0,40	0,35	0,40
	7	0,75	0,75	0,75
	880	0,55	0,50	0,50
Staph. aureus	8573	0,70	0,61	0,46
NCTO 425	880	0,50	0,50	0,50
Pseudomonas aeruginosa		0,86	0,90	0,63

## 2. Ergebnisse

Die Stabilitätsuntersuchungen haben die hochgradige Stabilität des spritzfertigen OTC-Komplex-Injektionspräparates erwiesen. Die Resultate bezüglich der Stabilität der verschiedenen Tri-OTC-Injektionspräparate veranschaulicht Tabelle 2.

Die Extinktionswerte der bei unterschiedlichen Temperaturen gehaltenen Präparate sind bei dem Absorptionsmaximum von 343 nm praktisch gleich. Der Verlauf der Absorptionskurven stimmt vollkommen überein. Der nach der Lagerung gemessene OTC-Gehalt ist in Tabelle 2 im Verhältnis zum ursprünglichen Wert in Prozent angegeben. Trotz der relativ hohen Temperaturen und der langen Aufbewahrungsdauer verfügten die Präparate laut den mikrobiologischen Untersuchungsbefunden auch nach der Lagerung über 90-100% der ursprünglichen Antibiotikumaktivität. Der Chemismus der bei verschiedenen Temperaturen gelagerten Ampullen der identischen Präparatserien stimmte überein, weshalb an Tabelle 2 nur ein pH-Wert angegeben ist. Im untersuchten Bereich (pH = 7,9 - 8,8) besteht betreffs der Stabilität der einzelnen Proben keine wesentliche Abweichung.

Das chromatografisch und bioautografisch untersuchte, spritzfertige Tri-OTC lieferte Flecke gleicher  $R_F$ -Werte (System I:  $R_F = 0,75$ ; System II:  $R_F = 0,44$ ) und gleicher antibiotischer Aktivität wie das in Wasser gelöste OTC · HCl, unabhängig davon, ob die Lagerung 3 Jahre lang bei 0 °C oder bei Raumtemperatur erfolgt war.

Die Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse der an Hühnerembryonen-Fibroblastenkulturen angestellten Untersuchungen. Um das PMOTC enthaltende Loch waren die Zellen zugrundegegangen. Um die 50 mg/ml spritzfertige Tri-OTC-Injektionslösung wiesen die Zellen ähnliche Schädigungen wie im Falle der 25 mg/ml

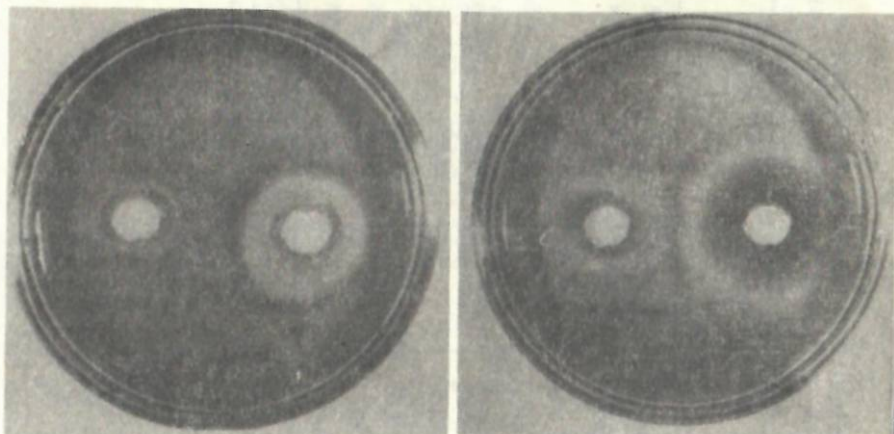
**Tabelle 2:** H<sup>+</sup>-Ionenkonzentrationswerte und Antibiotikumsgehalt (in Prozent des Originalwertes - 50 mg/ml) der 28 d bei verschiedenen Temperaturen bzw. 3 Jahre bei Raumtemperatur aufbewahrten Ampullen

Charge Nr.	pH	Temperaturen			Raumtemperatur
		0 °C	36 °C	58 °C	
1	7,90	100 <sup>x</sup>	100 <sup>x</sup>	93,4 <sup>x</sup>	100 <sup>xx</sup>
2	8,243	100 <sup>x</sup>	100 <sup>x</sup>	93,4 <sup>x</sup>	100 <sup>xx</sup>
3	8,300	100 <sup>xx</sup>	100 <sup>xx</sup>	93,4 <sup>x</sup>	100 <sup>xx</sup>
4	8,80	100 <sup>x</sup>	100 <sup>xx</sup>	86,2 <sup>x</sup>	90 <sup>xx</sup>
5	8,208	100 <sup>x</sup>	95,2 <sup>x</sup>	82,6 <sup>x</sup>	90 <sup>xx</sup>
6	-	100 <sup>x</sup>	92,6 <sup>x</sup>	94,0 <sup>x</sup>	100 <sup>xx</sup>
7	8,305	100 <sup>x</sup>	98,6 <sup>x</sup>	92,0 <sup>x</sup>	100 <sup>xx</sup>
8	8,305	100 <sup>x</sup>	100 <sup>xx</sup>	89,5 <sup>x</sup>	100 <sup>xx</sup>
9	8,388	100 <sup>x</sup>	100 <sup>xx</sup>		

x = spektroskopische Bestimmung  
 xx = mikrobiologische Bestimmung

**Abbildung 1:** Die Wirkung von Tri-OTC und von PMOTC auf Hühnerembryonen-Fibroblastzellen

- a) Die Zellkultur wurde mit 1%iger wässriger Lösung von PMOTC und mit wasserverdünnter 1%iger spritzfertiger Tri-OTC-Lösung beschickt.
- b) Die Zellkultur wurde mit 2,5%iger wässriger PMOTC- bzw. mit 5%iger spritzfertiger Tri-OTC-Lösung beschickt.



a

b

PMOTC-Lösung auf, aber in wesentlich milderem Grade. Bei Anwendung gleichkonzentrierter Lösungen (10 mg/ml) hatte das Tri-OTC die Zellen praktisch nicht destruiert, während im Umkreis der PMOTC-Lösung eine annähernd gleich starke Zellschädigung vorlag wie bei der Konzentration von 25 mg/ml. (Unter Berücksichtigung des pH-Wertes der PMOTC-Lösung haben wir auch NaCl-Lösung vom pH = 5,0 untersucht; eine zellschädigende Wirkung bestand hier nicht.)

Die HEP-2-Zellen erwiesen sich bei Anwendung von in Wasser gelöstem Tri-OTC morphologisch als intakt. Im Falle des PMOTC hafteten die Zellen entweder überhaupt nicht an der Wand der Reagenzröhrchen, oder sofern sie hafteten, kam es nicht zur Teilung, sie waren abgerundet und glitten schließlich von der Wand des Kulturgefäßes herab.

Subkutan injiziert bewirkten weder die Tri-OTC-, noch die PMOTC-Lösungen Gewebeschädigungen.

Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen: Die LD<sub>50</sub>-Werte liegen sowohl beim PMOTC als auch beim Tri-OTC-Komplex oberhalb 250 mg/kg. Applikation noch höherer Dosen ist bei Tri-OTC umständlich und beim PMOTC wegen seines außergewöhnlich großen Volumens schon gar nicht durchführbar. (Die verabreich-

ten 250 mg/kg bedeuten im Falle 20 g schwerer Mäuse 0,2 ml PMOTC-Lösung von der Konzentration 25 mg/ml, im Falle der Tri-OTC-Lösung aber nur 0,1 ml Lösung.)

Nach Verabreichung des Tri-OTC-Komplexes hielt das Sterben der Tiere 6-8 d kontinuierlich an; PMOTC ist von akuterer Wirkung: das Sterben der Tiere war binnen 3 d beendet. Die Toxizität des Lösungsmittels ist geringen Grades, denn nach iv. Injektion von 0,2 ml gingen binnen 21 d nur 10% der Versuchstiere ein; in der Tat gelangte selbst bei Verabreichung der LD<sub>50</sub>-Gabe nur 0,1 ml Lösungsmittel zur Anwendung.

Die in-vitro-Untersuchungen ergaben eine minimale hemmende Konzentration des Tri-OTC-Komplexes, die in der Mehrzahl der Fälle niedriger war als die des PMOTC und in der Hälfte der Untersuchungen auch niedriger als die des OTC (Tab. 1).

Bei den in-vivo-Untersuchungen zeitigte der OTC-Komplex höhere, mehr prothrombierte Bluttiter als das PMOTC (Abb. 2). Die von den Kurven eingeschlossenen Flächen (1-8 h), welche die nach DIMMLING (2) berechneten Antibiotika-Aktivitäten des Serums darstellen, betragen im Falle des Tri-OTC  $1,256 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \cdot \text{h}$  und im Falle des PMOTC  $0,973 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \cdot \text{h}$ .

Der Antibiotikumsgehalt der Organe war - mit Ausnahme der Lunge - nach Anwendung des Tri-OTC-Komplexes höher als nach PMOTC-Verabreichung. Einen besonders hohen OTC-Gehalt wies die Niere auf (Abb. 3).

### 3. Diskussion

Die hochgradige Stabilität der spritzfertigen Tri-OTC-Lösung ermöglicht deren jahrelange Aufbewahrung.

Die an Hühnerembryonen-Fibroblastkulturen und an HEp-2-Zellen vorgenommenen Untersuchungen haben gezeigt, daß die spritzfertige Tri-OTC-Lösung wesentlich weniger toxisch ist als die PMOTC-Lösung. Die qualitative Untersuchung des Präparates unter Berücksichtigung des LD<sub>50</sub>-Wertes und auch der minimalen inhibitorischen Konzentration in vitro läßt feststellen, daß das Tri-OTC-Präparat über weitaus günstigere in-vitro- und in-vivo-Eigenschaften verfügt als das PMOTC.

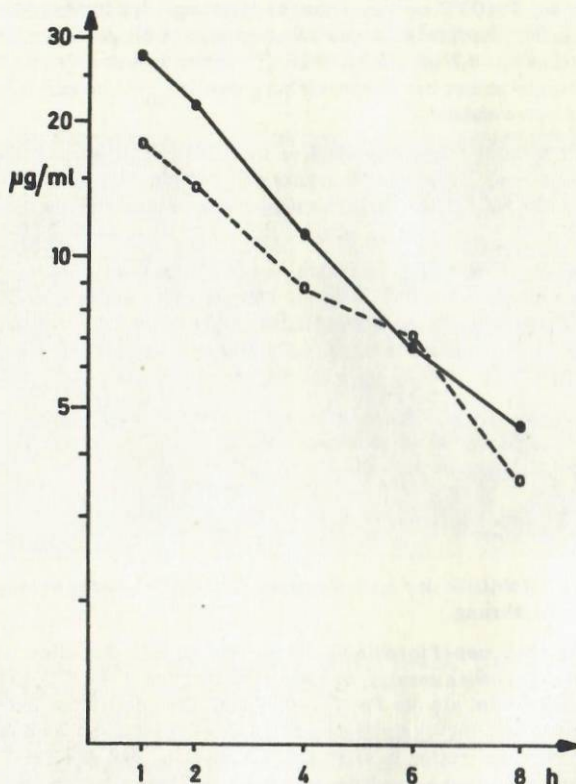
Die Antibiotikumkonzentration im Blut und in den Geweben unterstützt ebenfalls die günstigen biologischen Eigenschaften des Tri-OTC, wie ja auch die übrigen Tri-Tetrazykline über vorteilhafte biologische Eigenschaften verfügen (4, 5, 6). ILLES (3) hatte in Kaninchenversuchen PMOTC intraperitoneal verabreicht. Die von ihr und von uns in Kaninchenorganen gefundenen OTC-Gehalte stimmen in bezug auf das PMOTC überein.

### Zusammenfassung

Die „spritzfertige“, 50 mg/ml Oxytetrazyklin · HCl (OTC · HCl) enthaltende Lösung des Oxytetrazyklin-Trishydroxymethylaminomethan-Komplexes (Tri-OTC) hat ein pH von 7,9. Sie ist stabil und Jahre hindurch haltbar. Den Gewebe-

**Abbildung 2:** Antibiotikumkonzentration im Blutserum von Kaninchen

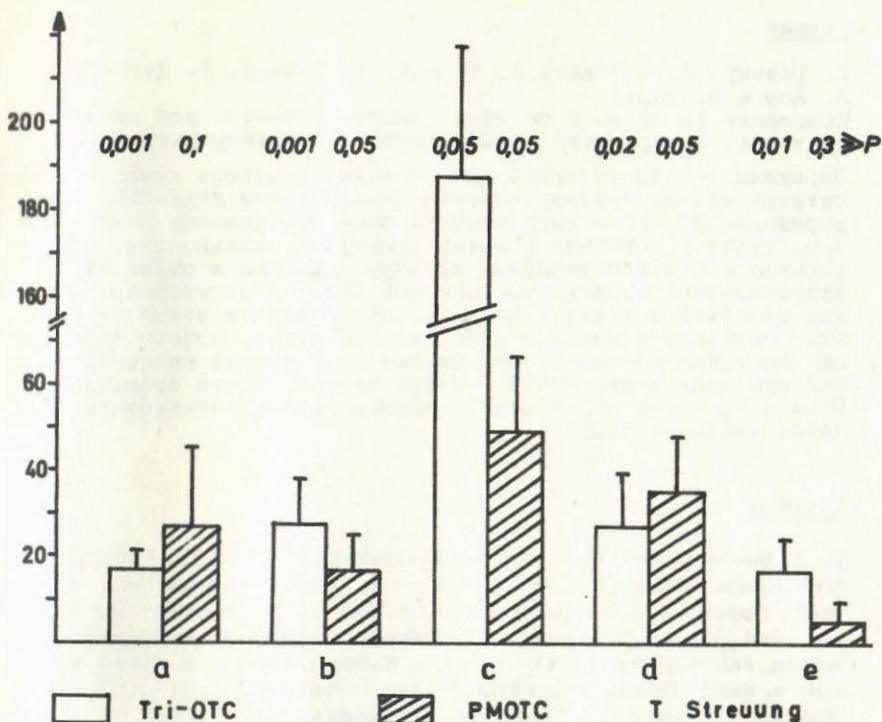
- nach iv. Verabreichung von 20 mg/kg Tri-OTC (10 Tiere).
- - -○- - nach iv. Verabreichung von 20 mg/kg PMOTC (4 Tiere).



züchtungsuntersuchungen gemäß ist sie - im Gegensatz zum Pyrrolidinomethyl-oxytetracyklin (PMOTC) - für die Gewebe nicht toxisch. Der iv.  $\text{LD}_{50}$ -Wert des Tri-OTC liegt bei Mäusen oberhalb von 250 mg/kg. Die Hemmwirkung in vitro tritt bei niedrigeren minimalen Konzentrationen ein als im Falle des PMOTC. Nach iv. Verabreichung zeigt Tri-OTC bei Kaninchen einen höheren Antibiotikuntiter als das PMOTC.



**Abbildung 3:** Antibiotikumgehalt in Kaninchengeweben 24 h nach iv. Verabreichung von 20 mg/kg PMOTC bzw. 20 mg/kg Tri-OTC  
 a) Lunge, b) Leber, c) Niere, d) Muskel, e) Milz



**Summary**

H. Hammer, I.L. Kahán, I. Béládi, G. Szepesy, R. Pusztai, I. Joó and E. Tari:

Evaluation in vitro and in vivo of a new „ready-for-use” solution for injections containing a new oxytetracycline complex.

The pH of „ready-for-use” oxytetracycline trihydroxymethylamino methane complex (Tri-OTC), containing 50 mg/ml oxytetracycline hydrochloride, has been estimated to be 7.9. The solution is stable and can be stored for some years. Assays with tissue cultures demonstrated, contrarily to pyrrolidinomethyl oxytetracycline (PMOTC), no toxic effects on tissues. DL<sub>50</sub> of intravenously applied Tri-OTC has been determined in mice to be above 250 mg/kg. An inhibitory effect in vitro has been observed at lower minimal concentrations than

with PMOTC. Following intravenous application of Tri-OTC, rabbits developed a higher level of the antibiotic than following PMOTC.

### Резюме

Г. Гаммер, И.Л. Кохан, И. Белادي, Г. Сепеши, Р. Пустой, И. Йоо и Э. Торн:

Испытания *in vitro* и *in vivo* нового, готового для введения раствора, содержащего новый комплекс окситетрациклина.

Определилось pH готового для введения раствора комплекса окситетрациклина тригидроксиметиламинметаном /три-ОТЦ/, содержащего 50 мг/мл гидрохлорида окситетрациклина - это было 7,9. Раствор устойчив и можно хранить несколько лет. Исследования с помощью тканевых культур показали в различии с пирролидинометилкситетрациклином /ПМОТЦ/ отсутствие токсичных действий в тканях. LD<sub>50</sub> при внутривенном введении три-ОТЦа показала в мышцах больше чем 250 мг/кг. Эффект торможения *in vitro* оказался при нижних минимальных концентрациях чем при применении ПМОТЦа. После внутривенного введения три-ОТЦа в кроликах образовались высшие уровни антибиотика чем после введения ПМОТЦа.

### Literatur

- (1) H. Bamberg: Med. Welt, Stuttgart 14 (1960) S. 727. — (2) Th. Dimmling: Med. Klinik, München 67 (1972) S. 1632. — (3) E. Illés: Acta vet. Acad. sci. hung., Budapest 20 (1970) S. 139. — (4) I. L. Kahán u. H. Hammer: Chemotherapy, Basel 20 (1974) S. 148. — (5) I. L. Kahán u. H. Hammer: Arzneimittelforschung, Aulendorf (im Druck). — (6) I. L. Kahán, I. Pápai u. H. Hammer: Arch. klin. u. exper. Ophthalmol., Berlin (W) 190 (1974) S. 257. — (7) R. C. Kelly u. D. A. Buyske: Antibiot. & Chemother., Washington 10 (1960) S. 604. — (8) M. Schach v. Wittenau u. C. S. Delahun: J. Pharmacol. & exper. Therapeut., Baltimore 152 (1966) S. 164. — (9) I. Weisz-Vincze, I. L. Kahán u. T. Kovács: Optical rotatory dispersion, conductivity and UV absorption investigation of solution containing tetracyclines and tris (hydroxymethyl) aminomethane (im Druck).

Manuskripteingang: 26.8.1974

Anschrift:

Dr. Helga Hammer,  
Szeged/Ungarn, Postfach 407