

Apotheke des Universitätsklinikums<sup>1</sup>, Heidelberg und Institut für Pharmazeutische Chemie<sup>2</sup>, Technische Universität Braunschweig, Germany

## Kupferhistidin-Lösung zur Behandlung von Menkes' Kinky Hair Syndrom: Herstellung und Stabilität

T. HOPPE-TICHY<sup>1</sup>, T. H. NGUYEN<sup>1</sup>, B. W. HENTZE<sup>1</sup>, M. LORKE<sup>2</sup>

*Eingegangen am 8. April 2004, angenommen am 2. Juni 2004*

*Dr. Torsten Hoppe-Tichy, Apotheke Universitätsklinikum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 670, D-69120 Heidelberg*

*Torsten.Hoppe-Tichy@med.uni-heidelberg.de*

*Pharmazie 60: 205–207 (2005)*

Menkes' Kinky Hair Syndrom ist eine seltene Stoffwechselerkrankung bei Neugeborenen, die eine Kupfermalabsorption zur Folge hat. Die betroffenen Patienten profitieren, wenn die Erkrankung frühzeitig diagnostiziert wird, von subkutanen Kupfergaben. Die hier vorgestellte Kupferhistidin-Lösung hat gegenüber früher publizierten Herstellungsvorschriften den Vorteil, dass sie ausgesprochen stabil ist und somit für die Patienten und die behandelnden Ärzte und Eltern die Möglichkeit einer ambulanten Therapie oder Heimtherapie bringt.

### **Manufacturing and stability of copper-histidine solution for treatment of Menkes' Kinky Hair Syndrome**

Menkes' Kinky Hair Syndrom is a rare, X-linked recessive multisystemic lethal disorder of copper metabolism. Male infants who are affected usually die at the age of 2–3 years. If the disease is diagnosed early, patients profit from subcutaneously administered copper salts. We describe the preparation and stability of a copper-histidine solution. This solution has some advantages in terms of stability over the solutions described in earlier publications. This is a great advantage for the patients and their parents, because an ambulatory care or a home care of this patients is possible now.

### **1. Einleitung**

Menkes' Kinky Hair Syndrom ist eine angeborene Stoffwechselerkrankung. Dabei handelt es sich um eine Kupferdefizienzerkrankung bei Kindern, die erstmalig von Danks et al. (1972) beschrieben wurde. Die Erkrankung wird rezessiv vererbt. Im Allgemeinen kommt es in einem Zeitraum von sechs Wochen bis sechs Monaten nach der Geburt zum Auftreten der ersten Symptome. Anfangs können dies Übelkeit und Erbrechen sowie Diarrhoe, dann Schwierigkeiten bei der Ernährung, fehlende Körperspannung und Krämpfe sein. Auffällig ist ferner die Struktur der Haare, die der Erkrankung den Namen gab. Auch letzteres Phänomen beruht auf der durch die Krankheit vorgegebenen Schwierigkeit der Kinder, Kupfer aus der Nahrung zu absorbieren. Der niedrige Prozentsatz des absorbierten Kupfers reicht gerade aus, um eine Anämie zu verhindern. Es können allerdings kein Ceruloplasmin, keine Konjugate mit oxidativen Enzymen und eben keine cross-linkages im Keratin des Haares oder im Elastin der Arterienwände ausgebildet werden. Bei Aufnahme umfasst das klinische Bild häufige, unkontrollierbare Krämpfe und eine progressive cerebrale Verschlechterung mit Hypotonie und Spastizität. Normalerweise sterben die Patienten in einem Alter von unter 3 Jahren. In den ersten Studien, die in Südaustralien durchgeführt wurden (Danks et al. 1972),

wurde eine Inzidenz der Erkrankung von 1:35000 Lebendgeburten geschätzt.

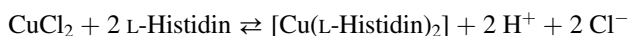
Aufgrund der bei den ersten Patienten festgestellten Kupfer-Malabsorptionen gingen bereits die ersten Therapieansätze in Richtung einer Kupfersupplementation. Die orale Gabe von verdünnter Kupfersulfat-Lösung in einer Größenordnung von 10 mg/Tag führte bei einem Kind nur zu einer geringfügigen Verbesserung des Kupfer-Plasmaspiegels (Walker-Smith et al. 1973). An Schafen konnten Camargo et al. (1962) und Vagg (1972) zeigen, dass die parenterale Gabe von Kupfer-EDTA-Chelat eine Kupferdefizienz heilen konnte. Die hieraus von Walker-Smith et al. (1973) abgeleitete intramuskuläre Gabe von Kupfer-EDTA-Chelat entsprechend 2 mg Kupfer führte bei einem Kind zu einer starken Anhebung des Kupfer-Plasmaspiegels und des Kupferoxidase-Plasmaspiegels, der als Surrogat für Caeruloplasmin herangezogen werden kann. Eine weitergeführte Therapie mit täglicher Gabe von Injektionen mit 1 mg Kupfer als EDTA-Chelat führte zu einer Normalisierung der Plasmaspiegel für Kupfer und Kupferoxidase. Nichtsdestotrotz verstarb das Kind, ohne neurologisch in irgendeiner Weise von der Therapie profitiert zu haben, im Alter von 14 Monaten an einer Bronchopneumonie. In einer anderen Untersuchung favorisierten Dekaban und Steusing (1974) die subkutane Gabe von Kupfersulfat-Lösungen.

Nadal und Baerlocher (1988) führten eine Therapie mit der parenteralen Gabe von Kupferhistidin und gleichzeitiger oraler Gabe von D-Penicillamin ein. Letzteres soll dazu dienen, die negativen Effekte einer möglichen Kupferakkumulation in Organen zu verhindern.

Leclercq et al. (1996) beschrieben die Herstellung und Stabilität einer Kupferhistidin-Lösung zur Behandlung von Menkes' Kinky Hair Syndrom. Sie zeigten, dass eine Lösung auf Basis isotonomischer Kochsalzlösung von Kupfer(II)-chlorid und L-Histidin in einem Molverhältnis von 1:2 (Lösung A) nach Einstellung auf pH 7,4 stabil ist. Allerdings soll die so zubereitete Lösung bei +4 °C und im Dunkeln aufbewahrt werden.

Erste eigene Versuche mit dieser Rezeptur zeigten eine Neigung von Kupferoxid, aus der entstehenden Lösung auszufallen. Die Niederschlagsbildung konnte scheinbar teilweise dadurch zurückgedrängt werden, dass die Abfüllung der Lösung unter Stickstoffbegasung durchgeführt wurde. Die Versuche hierzu waren allerdings nicht gut reproduzierbar.

Unter der Annahme, dass eine Kupferoxidbildung durch eine Verschiebung innerhalb der Gleichgewichtsreaktion



in Richtung Ausgangssubstanzen bedingt sein könnte, wurde in einem Versuchsansatz die Menge des zugegebenen L-Histidins um 50%, also zu einem Molverhältnis 1:3 erhöht (Lösung B).

## 2. Untersuchungen und Ergebnisse

Es wurden über den Untersuchungszeitraum bei der Lösung B keinerlei Farbänderungen oder Trübungen beobachtet. Es konnte festgestellt werden, dass die im Verhältnis 1:3 hergestellte Lösung B ausgesprochen stabil ist. Abb. 1 und 2 zeigen nahezu konstante Werte für die Extinktion und das Absorptionsmaximum dieser Lösung über 56 Tage. Im Gegensatz dazu kommt es bei Lösung A im Verhältnis 1:2, die zusätzlich nach Leclercq et al. (1996) mit Stickstoff begast wurde, schon nach kurzer Zeit zu einer starken Erhöhung der Extinktionswerte. Ferner kommt es zu einer Verschiebung der UV-Maxima hin zu kleineren Wellenlängen. Der Unterschied der Extinktionswerte zwischen den Lösungen A und B war signifikant ( $P = 0,001$ ), ebenso der Unterschied der UV-Maxima ( $P = 0,0001$ ).

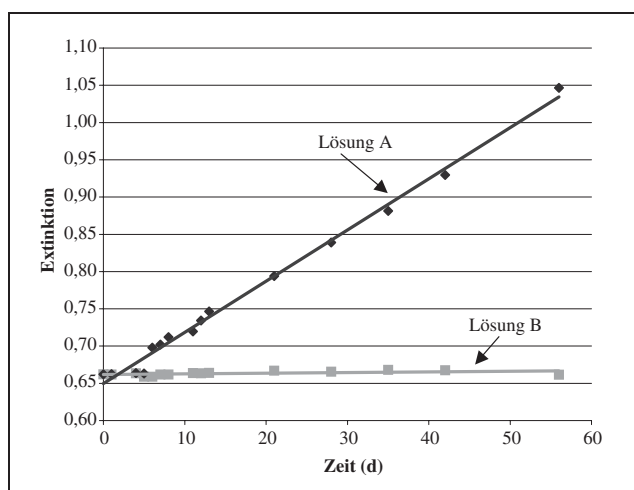


Abb. 1: Extinktionen der hergestellten Lösungen mit zugehörigen Trendlinien

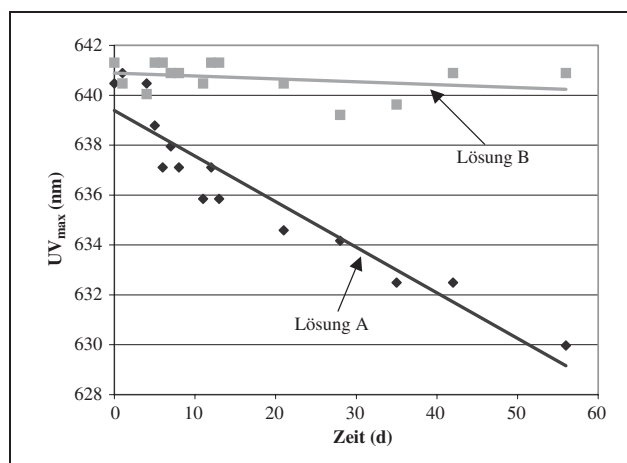


Abb. 2: Verschiebung der UV-Maxima von Lösung A

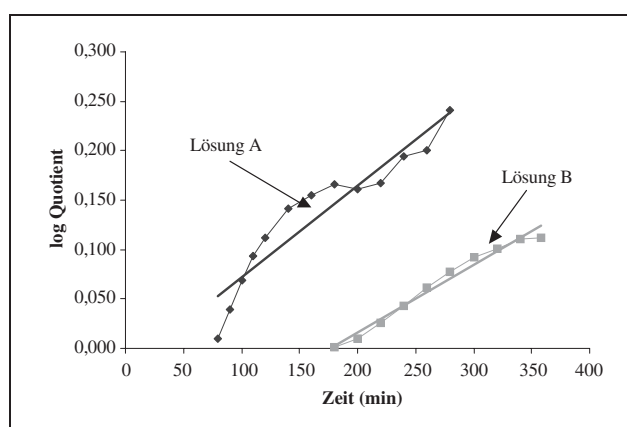


Abb. 3: Vergleich der Reaktionskinetik der Lösungen A und B bei 95 °C

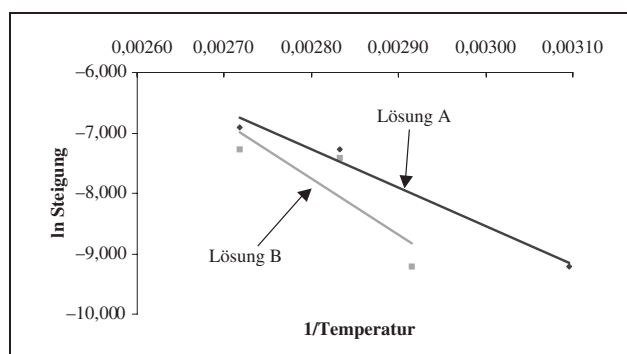


Abb. 4: Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und Temperatur der Lösungen A und B

Der Stresstest zeigt ebenfalls eine höhere Stabilität der Lösung B gegenüber der Lösung A bei jeder gemessenen Temperatur, woraus der Unterschied in der Kinetik beider Lösungen resultiert:

Regressionsgerade (Lösung A):  $y = 9 \cdot 10^{-4} - 0,0214$

Regressionsgerade (Lösung B):  $y = 7 \cdot 10^{-4} - 0,1213$ .

Bei einer Lagertemperatur von +2–8 °C wird für Lösung A eine Haltbarkeit von 16 Tagen berechnet, für Lösung B hingegen ergab sich bei gleicher Lagertemperatur eine Haltbarkeit von 14 Monaten.

## 3. Diskussion

Die bisherigen Stabilitätsbeobachtungen für Lösung A, bei der Kupferchlorid und L-Histidin im Verhältnis 1:2 einge-

setzt wurde zeigte, dass die Lösung nur begrenzt haltbar ist. Ferner wurde beobachtet, dass es zu Unterschieden in der Stabilität innerhalb einer Charge kam. Diese Grundlagen führten zu der Überlegung, den Histidin-Anteil um 50% zu erhöhen, um zu erreichen, dass das Gleichgewicht der Komplexbildungsreaktion auf Seiten des Komplexes liegt. Die gefundenen Ergebnisse stützen diesen Ansatz. Klinisch gesehen ist eine Erhöhung der Histidin-Konzentration irrelevant.

Das gefundene Absorptionsmaximum bei 641 nm steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kruck und Sarkar (1973). Diese Autoren fanden für den 1:2 Kupfer-Histidin-Komplex bei einem pH-Wert von 4,5–7,5 ein Absorptionsmaximum von 640 nm.

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, warum die Ergebnisse von Leclercq et al. (1996) im Hinblick auf die Stabilität nicht reproduziert werden konnten. Die „Überdosierung“ des L-Histidins stellte aber bei der vorliegenden Herstellungsvorschrift einen eindeutigen Vorteil gegenüber der älteren Rezeptur dar.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1. Material

Kupfer-(II)-chlorid wurde von der Firma Aldrich Chemical Co. bezogen (Ch.-B. 06811KU), L-Histidin von der Firma Sigma Aldrich Chemie (Ch.-B. 2400M-01702). Zum Lösen wurde isotonische Kochsalzlösung der Firma B. Braun Melsungen (Ch.-B. 2157C11 und 2263A95) verwendet.

### 4.2. Herstellungsvorschrift

#### 4.2.1. Lösung A 1:2

0,108 g Kupfer-(II)-chlorid und 0,244 g L-Histidin werden zu 100 ml mit isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Der pH Wert der Lösung wird mit 0,2 N NaOH (Fa. Merck) auf 7,4 eingestellt.

#### 4.2.2. Lösung B 1:3

Die Lösung wurde mit 0,3666 g L-Histidin hergestellt.

#### 4.2.3. Abfüllung und Aufbewahrung

Die Lösungen wurden zu 5 ml in 20 ml Ampullenfläschchen (Weißglas, steril) sterilfiltriert und mit Stopfen mit Flurotec-Folie verschlossen. Die Lösung 1:2 wurde bei der Abfüllung mit N<sub>2</sub> begast, hierauf wurde bei der Lösung 1:3 verzichtet. Die Kupferhistidin-Lösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

### 4.3. Haltbarkeitsprüfung

Zur Überprüfung der Stabilität wurden die Lösungen ohne weitere Verdünnung im UV-Spektrometer (Perkin Elmer UV Vis Spektrometer Lambda 12) im Zeitraum von 56 Tagen vermessen.

Für die Haltbarkeitsuntersuchung wurde der sogenannte Stresstest herangezogen. Dazu wurden beide Lösungen bei unterschiedlichen Temperaturen (4, 30, 50, 70, 80 und 95 °C) gelagert und in regelmäßigen Zeitintervallen (zunächst alle 10 min, dann alle 20 min) Proben der jeweiligen Lösungen entnommen und die Absorption im UV-VIS Spektrometer bestimmt. Mit Hilfe der Geraden in Abb. 4 und der Arrhenius-Gleichung  $k = A \times e^{-E/RT}$  ( $k$  = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante,  $A$  = Stossfaktor als Konstante,  $E$  = Aktivierungsenergie,  $R$  = Gaskonstante,  $T$  = Temperatur) kann die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für jede beliebige Temperatur bestimmt werden. Die Berechnung der Haltbarkeit erfolgt schließlich mit  $t_{90\%} = -\ln 0,9/k$ , definiert als die Zeit, innerhalb der die deklarierte Wirkstoffmenge auf 90% abnimmt.

### Literatur

- Camargo WV de A, Lee HJ, Dewey DW (1962) Suitability of copper preparations for parenteral copper therapy in sheep. Proc Australian Soc Animal Prod 4: 12–16.
- Danks DM, Campbell PE, Stevens BJ, Mayne V, Cartwright E (1972) Menkes' kinky-hair syndrome. An inherited defect in copper absorption with widespread effects. Pediatrics 50: 188–201.
- Dekaban AS, Steusing JK (1974) Menkes' kinky hair disease treated with subcutaneous copper sulphate. Lancet 1974: 1523.
- Kruck TPA, Sarkar B (1973) Structure of the species in the Copper (II)-L-Histidine system. Can J Chem 51: 3563–3571.
- Leclercq V, Torck M, Guislain B (1996) Contrôle de la stabilité d'une solution d'histidinate de cuivre. Ann pharm franc 54 : 85–88.
- Nadal B, Baerlocher K (1988) Menkes' disease: long-term treatment with copper and D-Penicillamine. Eur J Pediatr 147: 621–625.
- Vagg MJ (1972) Influence of EDTA on the retention and pathways of excretion of cobalt, copper, iron, manganese and zinc, after parenteral administration to sheep – mineral studies with isotopes in domestic animals. Proceedings of a symposium of International Atomic Energy Agency, Vienna, 1971.
- Walker-Smith JA, Turner B, Blomfield J, Wise G (1973) Therapeutic implications of copper deficiency in Menkes's steely-hair syndrom. Arch Dis Child 48: 958–962.