

**PHARMAKOKINETISCHE UND PHARMAKOGENETISCHE
STUDIEN ZUR OPTIMIERUNG UND INDIVIDUALISIERUNG
DER THERAPIE MALIGNER ERKRANKUNGEN
AM BEISPIEL VON
IDARUBICIN UND IRINOTECAN**



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT
ZU KIEL

VORGELEGT VON

NINA HOPPE

KIEL 2006

Referent:

PD Dr. T. Kunze

Korreferent:

Prof. Dr. Gieseler

Tag der mündlichen Prüfung:

01., 07., und 13. November 2006

Zum Druck genehmigt:

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
Abk.	Abkürzung
AL	Arbeitslösung
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AP	alkalische Phosphatase
APC	Metabolit des Irinotecans
Ara-C	Cytosin-Arabinosid, Cytarabin
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve)
$AUC_{0-t_{last}}$	AUC bis zum letzten gemessenen Wert
AUC_{∞}	Gesamtfläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
AUC_{Dosis}	AUC bezogen auf die Dosis
$AUC_{extrapol.}$	extrapolierter Anteil der AUC
AUMC	Gesamtfläche unter der ersten Moment-Kurve
BCRP	breast cancer resistance protein
BMI	body mass index
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CE	Carboxylesterase
C_{gem}	gemessene Konzentration
CL	Gesamtclearance
C_{max}	Maximalkonzentration
C_{nom}	nominale Konzentration
CPT-11	Irinotecan
CR	komplette Remission
C_{ss}	Plasmakonzentration im steady state
CTC	common toxicity criteria
CYP	Cytochrom P450
D	Dosis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPDH	Dihydropyrimidindehydrogenase
ED	early death
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

5-FU	5-Fluorouracil
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Gl.	Gleichung
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<i>i.v.</i>	intravenös
ICE	Idarubicin, Cytarabin, Etoposid
Ida	Idarubicin
Idaol	Idarubicinol
k.A.	keine Angaben
Kap.	Kapitel
k_e	terminale Eliminationskonstante
KG	Körpergröße
KI	Konfidenzintervall
KOF	Körperoberfläche
LDL	low density lipoproteins
MDR	multidrug resistance
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MRP	Multidrug Resistance Associated Protein
MRT	mittlere Verweildauer (mean residence time)
MS	Massenspektrometrie
MT	Mutante
MW	Mittelwert
NCI	National Cancer Institute
NPC	Metabolit des Irinotecans
NR	non-Responder
OATP	Organisches Anionen Transport Polypeptid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCR-CTPP	PCR with confronting two pair primers
P-gp	P-Glycoprotein
PR	partielle Remission
RE	Richtigkeit (relative error)
REC	Metabolisierungskoeffizient (relative extent of conversion)
REG	Metabolisierungskoeffizient (relative extent of glucuronidation)

RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RSD	relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SN-38	Metabolit des Irinotecans
SN-38-G	SN-38-Glucuronid
SNP	single nucleotide polymorphism
SP	Spikelösung
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
S-Phase	Synthese-Phase (Zellzyklus)
β-Glu	β-Glucuronidase
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
t_{max}	Zeit bis zur maximalen Konzentration
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
V	Volt
VLDL	very low density lipoproteins
V_z	Verteilungsvolumen
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	Weltgesundheitsbehörde (World Health Organization)
WT	Wildtyp

1 EINFÜHRUNG.....	1
<hr/>	
1.1 KREBS	1
1.2 THERAPIE MALIGNER TUMOREN	2
1.3 KONZEPTE ZUR THERAPIEINDIVIDUALISIERUNG IN DER ONKOLOGIE	4
1.3.1 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter	6
1.3.2 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakodynamischer Parameter	7
1.3.3 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakogenetischer Parameter	8
1.4 RATIONALE UND ZIELE	9
2 PHASE-IV-STUDIE ZUR INDIVIDUALISIERUNG DER IRINOTECAN-THERAPIE AUF DER BASIS PHARMAKOGENETISCHER PARAMETER.....	10
<hr/>	
2.1 EINLEITUNG	10
2.1.1 Kolorektales Karzinom	10
2.1.1.1 Tumorarten und Verteilung	10
2.1.1.2 Tumorausbreitung und Fernmetastasen	10
2.1.1.3 Therapie des kolorektalen Karzinoms	11
2.1.2 Irinotecan (CPT-11).....	12
2.1.2.1 Toxizität	13
2.1.2.2 Metabolismus von Irinotecan.....	14
2.1.2.3 Wirkungsmechanismus	15
2.1.2.4 Pharmakokinetische Eigenschaften	17
2.1.3 Pharmakogenetik	18
2.1.3.1 Genetische Polymorphismen im Bereich der Pharmakokinetik	19
2.1.3.2 Pharmakogenetik von Irinotecan	19
2.1.3.2.1 P-Glykoprotein (P-gp).....	20
2.1.3.2.2 Organisches Anionen-Transport-Polypeptid (OATP).....	21
2.1.3.2.3 UDP-Glucuronyltransferasen (UGT).....	23
2.1.4 Zielsetzung und Fragestellungen	24
2.2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.2.1 Material	26
2.2.2 Analytik von Irinotecan	26
2.2.2.1 Probenaufarbeitung	26
2.2.2.2 HPLC-Analytik	27
2.2.2.3 Kalibrierung	28

2.2.3	Genotypisierung	29
2.2.3.1	Isolierung der DNA.....	30
2.2.3.2	Analyse von Reinheit und Ausbeute der isolierten DNA.....	31
2.2.3.3	Amplifizierung der isolierten DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.3.4	Kontrolle des entstandenen Amplifikationsproduktes mittels Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE)	32
2.2.3.5	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen-Analyse (RFLP-Analyse)	34
2.2.3.6	Polymorphismus C1236T.....	34
2.2.3.7	Polymorphismus C3435T.....	36
2.2.3.8	Polymorphismus A388G	38
2.2.3.9	Polymorphismus G721A	39
2.2.3.10	Doppelmutation OATP-C*15.....	40
2.2.3.11	Polymorphismus UGT1A1*28	42
2.2.3.12	Berechnung der Genotyp- und Allelfrequenzen	43
2.2.4	Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakogenetik des Irinotecans	45
2.2.4.1	Studiendesign	45
2.2.4.2	Patientenkollektiv	45
2.2.4.3	Therapieplan und Studiendesign.....	47
2.2.4.4	Probenentnahmen	49
2.2.4.5	Probengewinnung, -aufarbeitung und -lagerung	49
2.2.5	Klinische Dokumentation.....	50
2.2.5.1	Demographische Daten.....	50
2.2.5.2	Laborparameter	50
2.2.5.3	Therapieassoziierte Toxizität	51
2.2.6	Pharmakokinetische Datenanalyse.....	51
2.2.6.1	Modellunabhängige Datenanalyse.....	52
2.2.7	Statistik	54
2.2.7.1	Deskriptive Statistik.....	54
2.2.7.2	Beschreibende Statistik.....	55
2.3	ERGEBNISSE	57
2.3.1	Quantifizierung von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G im Plasma	57
2.3.2	Validierung	60
2.3.2.1	Selektivität.....	60
2.3.2.2	Messbereich und Bestimmungsgrenze.....	61
2.3.2.3	Linearität	62
2.3.2.4	Wiederfindung	63
2.3.2.5	Richtigkeit und Präzision	65
2.3.3	Genotypisierung	67
2.3.3.1	Analyse von Reinheit und Ausbeute der isolierten DNA.....	67
2.3.3.2	Polymorphismus C1236T.....	67

2.3.3.3	Polymorphismus C3435T	68
2.3.3.4	Polymorphismus A388G	69
2.3.3.5	Polymorphismus G721A	69
2.3.3.6	Doppelmutation OATP-C*15.....	70
2.3.3.7	Polymorphismus UGT1A1*28	71
2.3.3.8	Genotypisierung der Patienten.....	72
2.3.4	Individuelle Pharmakokinetik von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G	75
2.3.4.1	Konzentrations-Zeit-Profile	75
2.3.4.2	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter für die verschiedenen Dosierungen des Irinotecans	78
2.3.4.3	Individuelle pharmakokinetische Parameter	80
2.3.4.4	Untersuchung der Metabolisierungskapazität für CPT-11 und SN-38	85
2.3.5	Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Pharmakokinetik des Irinotecans und seiner beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G	85
2.3.5.1	Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps C1236T	86
2.3.5.2	Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps C3435T	89
2.3.5.3	Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps A388G.....	92
2.3.5.4	Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps OATP-C*15.....	95
2.3.5.5	Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps UGT1A1*28.....	98
2.3.6	Toxizität	101
2.3.7	Zusammenhänge von pharmakokinetischen Parametern mit klinischen Effekten.....	102
2.3.8	Zusammenhänge von pharmakogenetischen Parametern mit klinischen Effekten.....	105
2.3.9	Individuelle Einflussfaktoren auf die Irinotecan-Pharmakokinetik	106
2.4	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	108
2.4.1	Bioanalytische Quantifizierungsmethode für Irinotecan und seine Metaboliten im Plasma.....	108
2.4.2	Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakogenetik des Irinotecans	110
2.4.2.1	Individuelle Pharmakokinetik von Irinotecan.....	110
2.4.2.2	Pharmakogenetik von Irinotecan	112
2.4.2.2.1	Einfluss der untersuchten Polymorphismen des P-Glykoproteins (P-gp) auf die Irinotecan-Pharmakokinetik	113
2.4.2.2.2	Einfluss der untersuchten Polymorphismen des OATP-C-Transporters auf die Irinotecan-Pharmakokinetik	115
2.4.2.2.3	Einfluss des untersuchten Polymorphismus der UDP-Glucuronyltransferase UGT1A1 auf die Irinotecan-Pharmakokinetik.....	118
2.4.2.3	Toxizität	120
2.4.2.4	Zusammenhänge von pharmakokinetischen Parametern mit klinischen Effekten unter Berücksichtigung der Pharmakogenetik.....	121

2.4.2.5	Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik	123
3	PHASE-IV-STUDIE ZUR OPTIMIERUNG DER IDARUBICIN-THERAPIE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER INFUSIONSDAUER	124
3.1	EINLEITUNG	124
3.1.1	Leukämien	124
3.1.1.1	Entstehung und Entwicklung der akuten Leukämien.....	126
3.1.1.2	Therapie der akuten Leukämien	126
3.1.1.2.1	Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML).....	127
3.1.1.2.2	Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL).....	128
3.1.2	Anthrazykline in der Chemotherapie	129
3.1.2.1	Idarubicin	130
3.1.2.1.1	Pharmakokinetik von Idarubicin	131
3.1.2.2	Wirkmechanismen der Anthrazykline.....	131
3.1.2.3	Toxizität	132
3.1.2.4	Prävention Anthrazyklin-induzierter Kardiotoxizität.....	133
3.1.3	Zielsetzung und Fragestellungen	134
3.2	MATERIAL UND METHODEN	135
3.2.1	Material	135
3.2.2	Analytik von Idarubicin	135
3.2.2.1	Probenaufarbeitung	135
3.2.2.2	HPLC-Analytik	137
3.2.2.3	Kalibrierung	137
3.2.3	Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Idarubicin und Idarubicinol.....	140
3.2.3.1	Studiendesign	140
3.2.3.2	Patientenkollektiv	140
3.2.3.3	Therapieplan und Studiendesign.....	143
3.2.3.4	Probenentnahmen	143
3.2.3.5	Probengewinnung, -aufarbeitung und -lagerung	143
3.2.4	Klinische Dokumentation.....	145
3.2.4.1	Demographische Daten.....	145
3.2.4.2	Laborparameter	145
3.2.4.3	Tumoransprechen	145
3.2.5	Pharmakokinetische Datenanalyse.....	146
3.2.5.1	Modellunabhängige Datenanalyse.....	146
3.2.6	Statistik	147
3.2.6.1	Deskriptive Statistik.....	147
3.2.6.2	Beschreibende Statistik.....	147

3.3	ERGEBNISSE	148
3.3.1	Quantifizierung von Idarubicin und Idarubicinol in biologischen Matrices.....	148
3.3.2	Validierung	152
3.3.2.1	Selektivität.....	152
3.3.2.2	Messbereich und Bestimmungsgrenze.....	154
3.3.2.3	Linearität	156
3.3.2.4	Wiederfindung	157
3.3.2.5	Richtigkeit und Präzision	158
3.3.3	Individuelle Pharmakokinetik von Idarubicin und Idarubicinol.....	159
3.3.3.1	Extrazelluläre Pharmakokinetik von Idarubicin und Idarubicinol.....	160
3.3.3.2	Intrazelluläre Pharmakokinetik von Idarubicin und Idarubicinol.....	165
3.3.3.3	Beziehung zwischen den extra- und intrazellulären Konzentrationen.....	170
3.3.3.4	Untersuchung der renalen Elimination.....	171
3.3.4	Einfluss des Albumin-Spiegels auf die Pharmakokinetik	172
3.3.5	Individuelle Einflussfaktoren auf die Idarubicin-Pharmakokinetik	174
3.3.6	Tumoransprechen	175
3.4	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	178
3.4.1	Bioanalytische Quantifizierungsmethoden von Idarubicin und Idarubicinol in biologischen Matrices.....	178
3.4.2	Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Idarubicins.....	180
3.4.2.1	Einfluss der Infusionsdauer auf die pharmakokinetischen Parameter des Idarubicins.....	181
3.4.2.2	Einfluss des Albumin-Spiegels auf die Pharmakokinetik	184
3.4.2.3	Tumoransprechen	186
4	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	188
5	ANHANG.....	192
<hr/>		
5.1	BEURTEILUNG DER TOXIZITÄT NACH KLASSIFIKATION DES NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI), „COMMON TOXICITY CRITERIA“ (CTC), 1999... 192	
5.2	MATERIALIEN	193
5.2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	193
5.2.2	Hergestellte Puffer und Lösungen.....	195
5.2.3	Verbrauchsmaterialien	197
5.2.4	Geräte	198
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	199

1 EINFÜHRUNG

1.1 Krebs

Krebs ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Jährlich erkranken in Deutschland etwa 424 000 Menschen an Krebs, von denen nur etwa ein Drittel geheilt werden kann. In Abbildung 1.1 ist der prozentuale Anteil der Zahl der Krebssterbefälle in Deutschland (im Jahr 2002) dargestellt. Hauptgründe für die hohe Sterblichkeit sind einerseits die zu späte Erkennung maligner Tumoren und andererseits die unzureichenden Therapiemöglichkeiten (Robert-Koch-Institut, 2006).

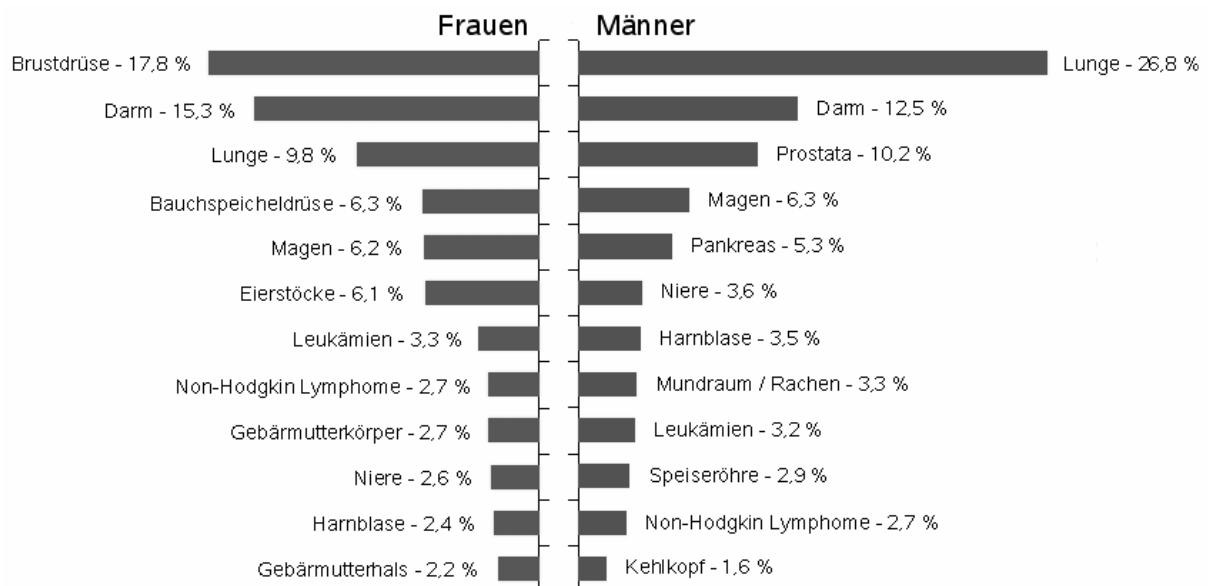


Abb. 1.1: Prozentualer Anteil der Krebssterbefälle in Deutschland (2002), (Quelle: <http://www.rki.de>).

Krebs ist keine einheitliche Krankheit, sondern ein Oberbegriff für mehr als hundert verschiedene bösartige maligne Erkrankungen. Nahezu jedes Gewebe unseres Körpers kann maligne Entartungen hervorbringen, zum Teil sogar mehrere unterschiedliche Typen. Jedes der Leiden wiederum hat seine eigenen Merkmale. Trotz dieser Verschiedenartigkeit entstehen alle Tumore durch ähnliche grundlegende Prozesse.

Einer der wichtigsten Fortschritte in der Tumorbiologie der letzten Jahre war der Nachweis, dass Krebs durch genetische Veränderungen verursacht wird.

Für das Verständnis der Krebsentstehung hat das Modell der klonalen Selektion (Nowell, 1976) eine grundlegende Bedeutung. Es beschreibt Krebs als eine Folge somatischer, also erworbener Mutationen, die eine einzelne Zelle und ihre Nachkommen mit einem Wachstumsvorteil über die anderen Zellen versehen. Diese Mutationen betreffen vor allem Wachstumskontrollgene. Der Ausfall dieser Kontrollgene verschafft der Zelle einen Selektionsvorteil, worauf sie sich schneller vermehren kann als die "Normalzellen".

Entsprechend dem Tumorprogressionsmodell, das beispielhaft von Vogelstein (1988) an den Stadien der Kolonkarzinomentwicklung etabliert wurde, handelt es sich bei der Krebsentstehung nicht um die Veränderung nur eines Gens, sondern um die sukzessive Akkumulation von Veränderungen in unterschiedlichen Genen, die letztlich zu Krebs führen. Das heißt, nur wenn eine kritische Anzahl von Mutationen erreicht ist, treten die malignen Eigenschaften einer Zelle auf.

Die Krebszellen beachten die üblichen Beschränkungen des Zellwachstums nicht mehr und folgen ihrem eigenen Vermehrungsprogramm. Hinzu kommt ihre Fähigkeit, den Ort ihres Entstehens zu verlassen, in benachbarte Gewebe einzudringen (Infiltration), sich abzusiedeln (Metastasierung) und selbst an weit entfernten Stellen im Körper zu neuen Wucherungen auszuwachsen. Tumore aus bösartigen Zellen werden häufig im Verlauf ihrer Entwicklung immer aggressiver. Sie können schließlich zum Tod führen, wenn sie lebenswichtige Gewebe und Organe bis zur Funktionsunfähigkeit schädigen (Destruktion) (Mutschler *et al.*, 2001).

1.2 Therapie maligner Tumoren

Die Behandlung maligner Tumoren basiert im Wesentlichen auf drei Säulen: Der operativen Entfernung des Tumorgewebes, der Strahlentherapie und der Chemotherapie (Hölzel *et al.*, 1996). Galten chirurgische Eingriffe und Bestrahlungen lange Zeit als einzige Behandlungsmöglichkeiten, so stellt die Entwicklung antitumoraler Chemotherapeutika eine wesentliche Erweiterung der Möglichkeiten in der Tumortherapie dar, die zu einer Verbesserung der Behandlungsergebnisse geführt hat. Oftmals wird durch die Chemotherapie aber nur eine Teilremission, eine Verbesserung der Lebensqualität, eine Linderung tumorbedingter Symptome und eine begrenzte Lebenszeitverlängerung erreicht (*palliative* Chemotherapie). Dies gilt besonders bei metastasierenden Neoplasien (Forth *et al.*, 2001). Vielfach steht der Heilung eine Resistenzentwicklung der entarteten Zellen unter der Therapie oder das Auftreten schwerwiegender, dosisbegrenzender Nebenwirkungen entgegen. Dann kann nur ein Teil der Tumorzellen irreversibel geschädigt, bzw. klinisch lediglich eine

längerfristige Remission erzielt werden, da sich die nicht geschädigten Zellen anschließend wieder vermehren und so zum Rezidiv führen.

Bei der *adjuvanten* Chemotherapie werden Zytostatika im Anschluss an eine erfolgreiche chirurgische Entfernung des Tumors zur Behandlung von Metastasen und zur Elimination verbleibender Tumorzellen eingesetzt (Mutschler *et al.*, 2001).

Von einer *neoadjuvanten* Chemotherapie wird gesprochen, wenn Zytostatika vor dem chirurgischen Eingriff oder der Bestrahlung appliziert werden, um eine Verkleinerung der Tumormasse zu erzielen.

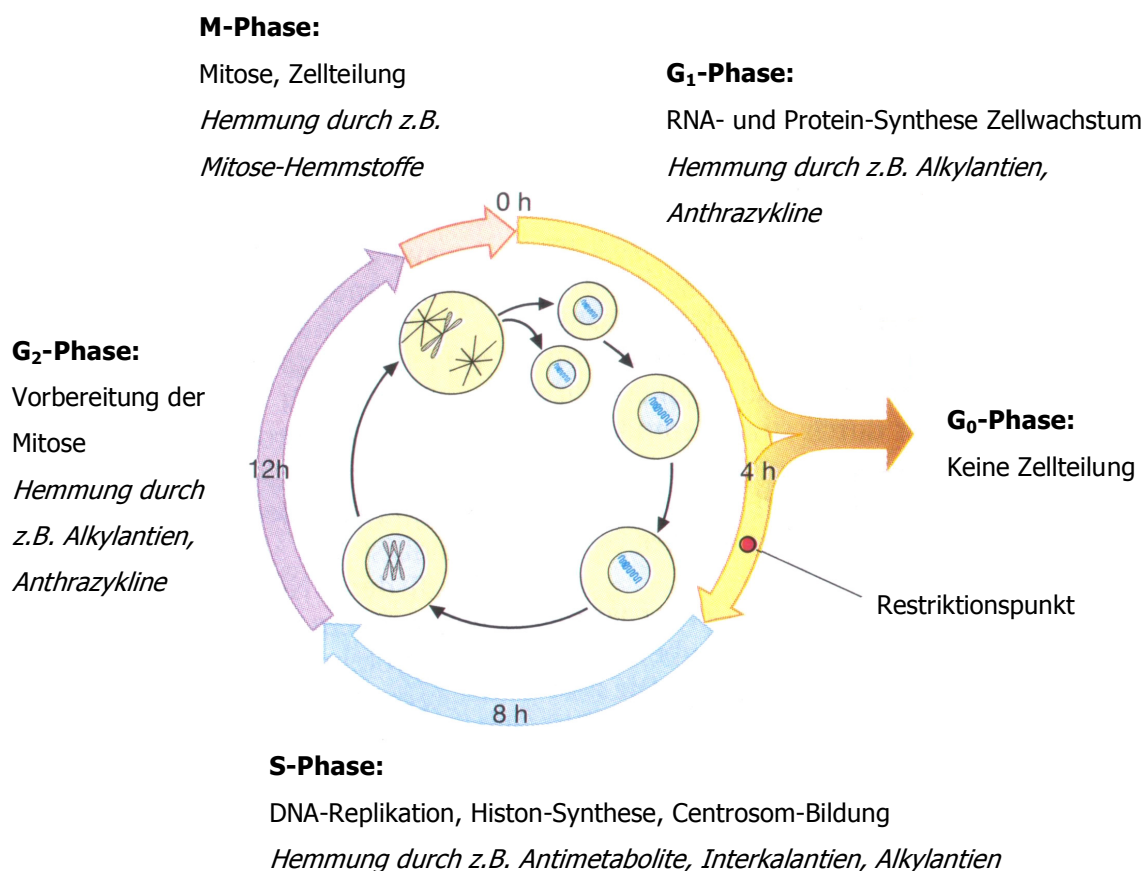


Abb. 1.2: Wirkung der Zytostatika-Klassen auf die Phasen des Zellteilungszyklus (Darstellung modifiziert nach Koolmann, 1998).

Heutzutage sind viele verschiedene klinisch zugelassene Zytostatika zur Behandlung von Tumoren verfügbar. Ihre Wirkung beruht zumeist auf Eingriffen in die verschiedenen Stoffwechselforgänge während der Zellteilung (Abb. 1.2) oder auf einer Wechselwirkung mit der DNA, und führt in den meisten Fällen zur Inhibition der Vermehrung der zellulären DNA (Kratz, 1995).

Aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Strukturen und Wirkmechanismen werden die Zytostatika in verschiedene Klassen eingeteilt (Erbar *et al.*, 1995):

- *Alkylantien*: z.B. Chlorambucil, Melphalan, Cyclophosphamid, Nimustin
- *Anthrazyklin-Antibiotika*: z.B. Idarubicin, Daunorubicin, Doxorubicin
- *Antimetabolite*: z.B. 5-Fluorouracil, Methotrexat, Thioguanin, Cytarabin
- *Mitose-Hemmstoffe*: z.B. Vinblastin, Vincristin, Paclitaxel
- *Platin-Analoga*: z.B. Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin
- *Topoisomerase-Inhibitoren*: z.B. Irinotecan, Topotecan, Etoposid

Tumorzellen unterscheiden sich nur geringfügig von gesunden Zellen, so dass die eingesetzten Zytostatika auch andere rasch proliferierende Zellen schädigen und dadurch schwere Nebenwirkungen auslösen, welche wiederum die zulässigen Dosen bei einer Zytostatika-Behandlung einschränken. Eine der wesentlichen Nebenwirkungen ist die Schädigung des Knochenmarks, die zu einer krankhaften Veränderung des Blutbildes führen kann (Hellman *et al.*, 1996). Daneben treten Schädigungen vor allem im Bereich der Keimdrüsen, der Schleimhäute, der Haarwurzeln, der Niere und der Nervenbahnen auf. Die Nebenwirkungen sind häufig so ausgeprägt, dass diese den Abbruch der Therapie bedingen (Mutschler *et al.*, 2001). Zytostatika sind demzufolge Wirkstoffe, bei denen heilende und toxische Effekte sehr nahe beieinander liegen: Ihre therapeutische Breite, d.h. der Bereich zwischen therapeutischer und letaler Dosis, ist für eine erfolgreiche Wirkung oft zu klein. Um die Wirksamkeit einer Zytostatika-Behandlung zu erhöhen werden häufig Kombinationen von verschiedenen Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und Toxizitätsprofilen eingesetzt. Auf diese Weise können die Gesamtdosis an antitumoralen Wirkstoffen erhöht und die Nebenwirkungen insgesamt verringert werden (Erbar *et al.*, 1995).

Fortschritte in der Chemotherapie werden vor allem von der Weiterentwicklung neuer oder bereits vorhandener Zytostatika erwartet.

1.3 Konzepte zur Therapieindividualisierung in der Onkologie

Für jede Arzneimitteltherapie wird ein möglichst günstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis angestrebt; d.h. die Behandlung soll möglichst effektiv und nur von geringen bzw. tolerablen unerwünschten Wirkungen begleitet sein. Dieses Ziel ist besonders für die Tumorthherapie anzustreben, da die verwendeten Zytostatika, für die nur eine sehr

geringe therapeutische Breite definiert werden kann, immer unerwünschte Wirkungen hervorrufen, die letztendlich therapielimitierend sein können.

Die Wirkung eines Arzneimittels hängt aber nicht nur von der Dosis ab, sondern wird durch verschiedene individuelle Charakteristika der Patienten beeinflusst. Eine Standarddosierung ist daher nur in seltenen Fällen optimal. Einige Patienten erhalten eine zu geringe Dosis und erfahren so keinen Behandlungserfolg, während bei anderen zwar ein Tumorsprechen festgestellt werden kann, die Therapie aber aufgrund der Toxizität abgebrochen werden muss. Diese interindividuelle Variabilität zwischen den Patienten kann zum Teil durch Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körpermaße, Gesundheitszustand, Vorbehandlung, Organfunktion und genetische Polymorphismen erklärt werden (Derendorf *et al.*, 2002).

Für die Effektivität einer Zytostatikatherapie konnten die Faktoren Allgemeinzustand, Ausmaß der Erkrankung (Anzahl der betroffenen Organe) und die Anzahl im Vorfeld verabreichter Chemotherapieprotokolle als *prädiktiv* für das Ansprechen ermittelt werden. Insbesondere beim kolorektalen Karzinom waren schlechter Allgemeinzustand, mehr als drei betroffene Organe und mehr als drei verschiedene Chemotherapien als Vorbehandlung verbunden mit einem signifikant geringeren Gesamtüberleben bzw. einer kurzen Zeit bis zur Tumorprogression (Bensmaine *et al.*, 2001). Auch genetische Dispositionen, wie z.B. Polymorphismen, erwiesen sich als bedeutsam für eine mögliche Vorhersage des Ansprechens eines Zytostatikums (Efferth *et al.*, 2005).

Neben den Unterschieden zwischen verschiedenen Patienten (*interindividuelle* Variabilität) können sich auch bei einem Patienten im Laufe einer Therapie Veränderungen ergeben, wie z.B. eine erworbene Resistenz des Tumors oder eine Veränderung des Allgemeinzustands; diese Veränderungen verursachen eine *intra*-individuelle Variabilität (Kloft *et al.*, 2003). Die *intra*- bzw. *interindividuellen* Unterschiede zeigen sich zum einen als Variabilität der pharmakokinetischen Prozesse wie Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Elimination, welche letztendlich die Menge des Arzneistoffs bestimmen, die am Wirkort ankommt. Neben anderen Faktoren bedingen diese aber auch eine Variabilität der Pharmakodynamik der Arzneistoffe, deren Wirksamkeit und somit auch den Erfolg einer Zytostatikatherapie.

Es ist daher wünschenswert, die Dosierung der Zytostatika individuell für jeden Patienten unter Berücksichtigung der individuellen Einflussfaktoren anzupassen.

Derzeit werden in der Onkologie Zytostatikadosen appliziert, die auf die Körperoberfläche (KOF) der Patienten normiert werden. Diese Vorgehensweise basiert auf der empirischen Beobachtung, dass die Körperoberfläche mit physiologischen Parametern wie Organgröße und Organleistung korreliert. Die Körperoberfläche wird in der Regel aus Körpergewicht (KG) und Körpergröße nach der Formel von Du Bois & Du Bois (1916) berechnet (Gl. 1.1), die auf einer Untersuchung von lediglich neun Erwachsenen zu Beginn des 20. Jahrhunderts basiert:

$$KOF [m^2] = KG [kg]^{0.425} * Körpergröße [cm]^{0.725} * 0.007184 [m^2/kg/cm]$$

Gl. 1.1

Ein Zusammenhang zwischen der Körperoberfläche und der Pharmakokinetik ist für die meisten Zytostatika aber nicht gegeben, so dass die hohe interindividuelle Variabilität bezüglich Antitumorwirkung und Toxizität mit dieser Strategie nicht verringert wird (de Jong *et al.*, 2004; Mathijssen *et al.*, 2002a).

Eine individuelle Dosisanpassung ist daher vor allem in der Zytostatikatherapie ausgesprochen sinnvoll. Diese Strategie wird bisher allenfalls in Ansätzen verfolgt, indem die Dosis empirisch modifiziert wird, wenn beispielsweise vorwiegend hepatisch eliminierte Zytostatika an leberinsuffiziente Patienten verabreicht werden.

Oft existiert keine direkte oder direkt messbare Korrelation zwischen der Dosis und dem auftretenden Effekt, so dass eine Anpassung der Dosis basierend auf den Effekten meist nicht realisierbar ist. Besteht aber ein Zusammenhang zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik oder Pharmakogenetik so können die angestrebten Effekte über pharmakokinetische Zielgrößen gesteuert werden.

1.3.1 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter

Eine Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter ist derzeit in der onkologischen Praxis kaum etabliert.

Im Rahmen klinischer Studien hat sich eine Dosierung unter Beachtung der individuellen Pharmakokinetik aber als praktisch durchführbar und zum Teil erfolgreich erwiesen (Kloft *et al.*, 2003). Als Zielgröße diente in der Mehrzahl der Studien die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the concentration time curve*, AUC), aber auch die Plasmakonzentration des Arzneistoffs im *steady*

state (C_{ss}), die erreichte Maximalkonzentration (C_{max}) oder die Zeit, in der die Konzentration der Substanz einen bestimmten Grenzwert überschritt, waren zur Optimierung der Dosierung und Verringerung der Variabilität geeignete Parameter (van den Bongard *et al.*, 2000).

Der einzige Arzneistoff, der auch in der klinischen Routine nicht mehr konventionell nach Körperoberfläche dosiert wird, ist Carboplatin. So zeigte sich für diesen Arzneistoff ein Zusammenhang zwischen der AUC und pharmakodynamischen Effekten wie der Myelosuppression (insbesondere Thrombozytopenie) sowie der Wirksamkeit. Außerdem wurde eine Korrelation zwischen der Nierenfunktion und der AUC gefunden, da der Arzneistoff überwiegend renal eliminiert wird. Die Vorbehandlung der Patienten mit myelosuppressiven Zytostatika und die Kombination von Carboplatin mit weiteren Zytostatika erhöhen das Risiko für eine Thrombozytopenie. Basierend auf diesen Erkenntnissen entwickelten Calvert *et al.*, (1989) eine Formel (s. Gl. 1.2), die die Berechnung der individuellen Carboplatindosis (D) auf Basis einer Ziel-AUC und der individuellen glomerulären Filtrationsrate (GFR) ermöglicht. Die Ziel-AUC wird in Abhängigkeit von der Vorbehandlung und dem angestrebten Chemotherapieprotokoll (Mono- oder Kombinationstherapie) gewählt. Mit Hilfe dieser Strategie können hohe Dosierungen für einen maximalen antitumoralen Effekt bei gleichzeitig akzeptabler Hämatotoxizität eingesetzt werden:

$$D [mg] = Ziel-AUC [mg * min/ml] * (GFR [ml/min] + 25)$$

Gl. 1.2

Auch für eine Reihe anderer Arzneistoffe konnte der positive Nutzen einer individuellen Dosisanpassung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter gezeigt werden.

1.3.2 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakodynamischer Parameter

Während eine Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakokinetischer Parameter, die letztendlich Surrogatparameter darstellen, für eine Reihe von Arzneistoffen untersucht wurde, ist die Dosierung mit Hilfe pharmakodynamischer Parameter zumindest im Bereich der Onkologie nur sehr schwer zu realisieren.

In der Therapie anderer Erkrankungen existieren leicht messbare pharmakodynamische Größen, wie z.B. die Blutglucosekonzentration oder der

Blutdruck, nach denen die Dosierung der verabreichten Arzneistoffe eingestellt werden kann (Kloft *et al.*, 2003). Für Zytostatika gibt es allerdings bisher keine pharmakodynamischen Parameter, die in der Routine wiederholt messbar sind.

Im Hinblick auf die Therapie mit einer Vielzahl der Zytostatika wäre die Messung der gebildeten Zytostatika-DNA-Addukte am Wirkort, dem Tumorgewebe, für die Optimierung der Therapie wünschenswert. Aufgrund der schlechten Zugänglichkeit ist die Umsetzung dieser Strategie in der Praxis kaum möglich. Daher existieren bisher nur wenige Daten, welche die pharmakodynamischen Parameter betrachten.

1.3.3 Dosisindividualisierung auf der Basis pharmakogenetischer Parameter

Einen weiteren viel versprechenden Ansatz stellt eine Dosisindividualisierung aufgrund genetischer Unterschiede dar. Neben den schon erwähnten Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Nieren- und Leberfunktion, krankheitsspezifischen Besonderheiten, Arzneimittelinteraktionen und Arzneimittelresistenzen beruhen die individuellen Unterschiede auch auf erblichen Unterschieden der am Metabolismus beteiligten Enzyme und der am Transport beteiligten Proteine und Rezeptoren.

Genetische Variabilität ist somit auf allen genannten Ebenen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik bekannt und teilweise auch bestimmbar. Momentan wird der Betrachtung onkologischer Therapien unter pharmakogenetischen Gesichtspunkten große Aufmerksamkeit gewidmet (Efferth *et al.*, 2005; Bosch, *et al.*, 2006; Sekine *et al.*, 2001). Pharmakogenetische Kenntnisse des Metabolismus ermöglichen in vielen Fällen eine individuelle Auswahl und Dosierung von Arzneimitteln. Die klinische Relevanz pharmakogenetischer Ansätze in der Onkologie soll an folgenden Beispielen verdeutlicht werden.

Uridindiphosphatglucuronyltransferasen (UGT) sind Schlüsselenzyme für die Entgiftung von Xeno- und Endobiotika, wie z. B. Bilirubin, Arzneimitteln oder Karzinogenen im Rahmen sog. Phase-II-Reaktionen. Die Substrate werden durch UGT glucuronidiert, wodurch sie in wasserlösliche Formen umgewandelt und anschließend mit Galle oder im Urin ausgeschieden werden können. Bisher wurden bis zu 33 Familien der UGT-Enzyme identifiziert (Testai, 2001). UGT werden von vielen Genen kodiert, die mit einer enormen Zahl an genetischen Polymorphismen behaftet sind (Nagar *et al.*, 2006). Genetische Polymorphismen der UGT1A1-, UGT1A7- und UGT1A9-Isoenzyme können für eine Irinotecanüberdosierung

verantwortlich sein (Ando *et al.*, 2000; Rouits *et al.*, 2004; Innocenti *et al.*, 2004).

Das Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) wird in der Leber durch die Dihydropyrimidindehydrogenase (DPDH) abgebaut. Ein genetischer Enzymdefekt bedingt durch einen Basenaustausch resultiert in einem katalytisch inaktiven Enzym mit daraus resultierenden toxisch erhöhten Serumkonzentrationen von 5-FU, die sich u.a. durch lebensbedrohliche Diarrhö und vor allem Leukopenien äußern. Nach initialer Genotypisierung und Enzymaktivitätsbestimmung könnte gewährleistet werden, dass dieses Medikament ausschließlich bei jenen Tumorpatienten Anwendung findet, bei denen ein Defekt im DPDH-Gen ausgeschlossen werden kann (Krüth *et al.*, 2003).

Auch genetische Polymorphismen in Transporterproteinen üben Einfluss auf Reaktionen und Resistenzen bestimmter Arzneimittel aus. Genprodukte sogenannter ABC-Transporter, z.B. ABCB1 (P-Glykoprotein), ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2) bestimmen orale Absorption und Bioverfügbarkeit zahlreicher Medikamente. Natürlich vorkommende Variationen der ABC-Transportergene, die die Funktion und Expressionsspiegel der Proteine regulieren, entscheiden somit über einen möglichen therapeutischen Erfolg (Kirchheiner *et al.*, 2003).

Die gezielte Suche nach genetischen Polymorphismen durch Sequenzierung genomischer DNA-Fragmente vor Beginn einer Behandlung kann zu einer besseren Abschätzung des erwarteten Erfolgs einer Arzneimitteltherapie gegenüber möglichen Nebenwirkungen beitragen. Und da sich genetische Eigenschaften im Laufe des Lebens nicht ändern, muss die Bestimmung therapierelevanter Mutationen nur einmal vorgenommen werden.

1.4 Rationale und Ziele

Trotz großer Anstrengungen existieren nur für wenige Zytostatika geeignete Strategien zur Dosisindividualisierung, obwohl diese einen wichtigen Beitrag zur Wirksamkeit und Sicherheit der Zytostatika leisten könnten.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden zwei Phase-IV-Studien zur Therapie zweier maligner Erkrankungen durchgeführt, mit dem Ziel, die bisher bestehenden Dosierungsschemata aufgrund pharmakokinetischer oder pharmakogenetischer Parameter zu optimieren und individualisieren.

2 PHASE-IV-STUDIE ZUR INDIVIDUALISIERUNG DER IRINOTECAN-THERAPIE AUF DER BASIS PHARMAKOGENETISCHER PARAMETER

2.1 Einleitung

2.1.1 Kolorektales Karzinom

Krebserkrankungen des Dickdarms (Kolon) und Mastdarms (Rektum) werden zusammen als kolorektales Karzinom oder Darmkrebs bezeichnet. Das kolorektale Karzinom gehört in der Bundesrepublik Deutschland zu den häufigsten Krebserkrankungen. Jährlich wird nach Angaben des Robert-Koch-Instituts Berlin bei 57. 000 Einwohnern die Diagnose Darmkrebs neu gestellt. Bei Frauen ist Darmkrebs mit nahezu 30. 000 Neuerkrankungen die zweithäufigste, bei Männern mit über 27. 000 Neuerkrankungen die dritthäufigste Krebsart. Männer sind zum Zeitpunkt der Diagnose durchschnittlich 67 Jahre alt, Frauen 72 Jahre (Deutsche Krebshilfe, Darmkrebs, 2004).

2.1.1.1 Tumorarten und Verteilung

85 bis 90% der bösartigen Darmtumore sind Adenokarzinome des Dickdarms, die sich aus den Drüsen der Darmschleimhaut ableiten. Oft finden sich bei Entdeckung des Tumors bereits ein zentrales Geschwür (Ulkus) und ein Gewebsuntergang (Nekrose). Histologisch kommen neben Adenokarzinomen vor allem muzinöse Adenokarzinome (5 - 10%) und Siegelringkarzinome (1%) vor. Andere bösartige Erkrankungen des Darms wie Karzinoide, Leiomyosarkome und gastrointestinale Stromatumoren, die sich aus der glatten Muskulatur bzw. dem Bindegewebe der Darmschleimhaut ableiten, sind selten und machen zusammen weniger als 2% aller Darmkrebsfälle aus (Einteilung nach WHO, 2000).

2.1.1.2 Tumorausbreitung und Fernmetastasen

Kolorektale Tumore infiltrieren die Darmschichten, breiten sich örtlich ins umgebende Fettgewebe aus, sowie zumeist lymphogen entlang der Lymphabflusswege an den venösen Gefäßen, bzw. in regionäre Lymphknoten. Nach Einbruch in die Gefäße breitet sich das Karzinom hämatogen aus. Bei etwa 25% aller Patienten treten Fernmetastasen auf. Diese befinden sich zu 69 - 80% in der Leber, entsprechend

dem venösen Abfluss über das Pfortadersystem. In bis zu 30% der Fälle bleibt die Leber der einzige Ort der Metastasierung (Fong *et al.*, 1995). Die Leber ist auch nach potentiell kurativer Resektion gastrointestinaler Tumore der häufigste Ort der Fernmetastasierung (Weiss *et al.*, 1985). In ihrer Häufigkeit folgen Lungen-, Skelett-, Nebennieren- und Gehirnetastasen.

2.1.1.3 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie richtet sich vor allem nach der Tumorlokalisation und dem Tumorstadium. In der Regel wird eine vollständige Resektion des tumortragenden Darmabschnittes mit Entfernung des zugehörigen Lymphabflussgebietes angestrebt. Die Heilungschancen sind in frühen Stadien sehr gut (Tumorzentrum Freiburg, 2006).

Chirurgie

Die chirurgische Entfernung des Tumors ist bei Darmkrebs auch im fortgeschrittenen Stadium oder beim Vorliegen von Metastasen die Therapie der Wahl, schon um die Entstehung von Komplikationen, wie beispielsweise eines Ileus, zu vermeiden. Als standardisierte Eingriffe werden Tumoren des *Colon ascendens* als rechtsseitige Hemikolektomie und des *Colon descendens* als linksseitige Hemikolektomie entfernt. Die Prognose beim Rektumkarzinom hat sich in den vergangenen Jahren erheblich durch den Einsatz moderner Operationsverfahren, wie z. B. die Transanale Endoskopische Mikrochirurgie oder die Totale Mesorektale Exzision, verbessert (Hoffmann, 2003).

Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist für das Kolonkarzinom eher bedeutungslos und als selten indiziert einzuschätzen, da eine Strahlenbelastung des empfindlichen Dünndarms hierbei unvermeidlich ist.

Im Gegensatz dazu wird das Rektumkarzinom in bestimmten Stadien adjuvant präoperativ zum *Down-Staging* (Mendenhall *et al.*, 1992) oder adjuvant postoperativ bestrahlt. Sehr selten kann eine intraoperative Bestrahlung zum Einsatz kommen (Sadahiro *et al.*, 2001).

Chemotherapie

Die Möglichkeiten der chemotherapeutischen Behandlung haben sich in den letzten Jahren durch die Zulassung neuer Substanzen deutlich verbessert. Zu den wirksamsten Einzelsubstanzen zählt nach wie vor 5-Fluorouracil (5-FU), sowie Irinotecan und Oxaliplatin. Die oral aktiven 5-FU Analoga Uracil/Tegafur (UFT[®],

Bristol-Myers Squibb) sowie Capecitabin (Xeloda[®], Roche), die mittlerweile in Deutschland zugelassen sind, erzielen Ansprechraten, die Infusionsprotokollen von 5-FU und Folinsäure entsprechen. Der größte Vorteil der oral aktiven Verbindungen dürfte aber in ihrer Darreichungsform liegen, sie erlaubt es dem Patienten, die palliative Therapie zu Hause durchführen zu können. Auch Antikörpertherapien mit Cetuximab (Erbix[®], Merck) und Bevacizumab (Avastin[®], Roche) haben sehr gute Ansprechraten gezeigt und so das Spektrum der Behandlungsmöglichkeiten erweitert.

Die Empfehlungen zu den systemisch durchgeführten Chemotherapien unterscheiden sich, je nach dem, ob es sich um ein Kolon- oder Rektumkarzinom handelt und welches Stadium vorliegt. Bei frühen Stadien (ohne Lymphknotenbefall) ist eine weiterführende Chemotherapie nach heutigem Stand nicht indiziert. Anders stellt sich die Situation bei einer lokal fortgeschrittenen und lymphatisch metastasierenden Erkrankung dar. Hier kann durch zusätzlich zur Operation eingesetzte Chemotherapie ein Überlebensvorteil erreicht werden (Tumorzentrum Freiburg, 2006).

2.1.2 Irinotecan (CPT-11)

Irinotecan leitet sich von Camptothecin ab, welches in den frühen 60er Jahren entdeckt worden ist. Camptothecin wird aus dem Pflanzenextrakt eines in Asien beheimateten Baumes (*Camptotheca acuminata*) isoliert. Seine antineoplastische Aktivität wurde schon sehr früh nachgewiesen. Doch zeigte Camptothecin eine sehr hohe Harnblasentoxizität, die mit seiner schlechten Wasserlöslichkeit in Verbindung gebracht wird. Daher suchte man nach Derivaten mit gleicher tumorhemmender Wirkung aber besserem Sicherheitsprofil. Aus einem dieser Forschungsprojekte resultierte Irinotecan, welches durch semisynthetische Prozesse aus Camptothecin gewonnen wurde (Schaepi *et al.*, 1974).

Irinotecan gehört inzwischen zu den wichtigsten Medikamenten in der Behandlung metastasierender, kolorektaler Karzinome. Bei Irinotecan handelt es sich um ein Prodrug; die eigentlich wirksame Substanz ist das SN-38, welches im Verlaufe des Metabolismus entsteht. SN-38 ist in etwa 100 - 1000-fach stärker zytotoxisch als die Muttersubstanz (Mathijssen *et al.*, 2001). In Phase-I- und Phase-II-Studien wurde die Effektivität von Irinotecan an Patienten mit fortgeschrittenen Kolon- und Rektumkarzinomen bestätigt und in der Second-line-Situation nach Versagen einer vorausgegangenen 5-Fluorouracil-Behandlung (5-FU) zeigte Irinotecan noch beachtliche Aktivität. Es war deshalb ein logischer Schritt, Irinotecan auch in der First-line-Standardtherapie einzusetzen. Ferner erschien es vernünftig, Irinotecan in der First-line-Therapie zu kombinieren. Als geeignete Kombinationspartner boten sich

5-FU und Folinsäure an (Yalcin *et al.*, 2003). Irinotecan und 5-FU besitzen eine signifikante klinische Monoaktivität und zeigen eine synergistische Wirkungsverstärkung. Die beiden Wirkstoffe haben einen unterschiedlichen Wirkmechanismus, so dass auch eine Kreuzresistenz weitgehend fehlt. Außerdem haben 5-FU und Irinotecan mit Ausnahme der Diarrhö wenig Überlappungen in ihren Toxizitätsspektren (Wilke, 2000).

2.1.2.1 Toxizität

Im Vordergrund der unerwünschten Wirkungen stehen bei Irinotecan die Neutropenie und die Diarrhö (Ratain, 2002).

Eine schwere Neutropenie (Grad 3/4) tritt in 10 - 20% der Fälle auf, kann aber durch die Gabe von *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) gut kontrolliert werden. Die Diarrhö kann zu verschiedenen Zeitpunkten auftreten und durch unterschiedliche Mechanismen bedingt sein (Saliba *et al.*, 1998).

Akute Diarrhöen treten während oder kurz nach der Infusion von Irinotecan auf. Sie werden durch eine cholinerge Wirkung des Irinotecans verursacht, welche sich auf eine Hemmung der Acetylcholinesterase (Dodds *et al.*, 1999) zurückführen lässt. In den meisten Fällen ist dieser frühe Durchfall kurzandauernd und nur selten schwerwiegend. Parallel zur Diarrhö treten oft zusätzliche Symptome eines cholinergen Syndroms wie Schwitzen, Schnupfen, gesteigerte Speichelproduktion und Gesichtsrötung auf. Die Gabe von Atropin (Kehrer *et al.*, 2001) kann diese Symptome und damit auch den Durchfall abmildern oder verhindern.

Verzögerte Diarrhöen treten meistens 3 - 6 Tage nach Irinotecan-Infusion oder noch später auf. Diese Durchfälle sind zumeist schwerwiegender, dauern länger an und können ohne Gegenmaßnahmen auch zu lebensbedrohlichen Zuständen infolge massiven Flüssigkeits- und Salzverlust führen. Als Richtwert für eine schwere Diarrhö gilt mehr als 10 Stuhlgänge am Tag oder Durchfall mit Blutbeimengung (NCI-CTC, 2002). Die verzögerte Diarrhö kann durch eine Therapie mit Loperamid gebessert werden (Abigeres *et al.*, 1994). Im Gegensatz zum frühen Durchfall werden für den späten Durchfall durch Irinotecan andere Mechanismen verantwortlich gemacht: Neben der anticholinergen Wirkung durch Blockade der Acetylcholinesterase, ist eine direkte Toxizität von SN-38 auf die gastrointestinale Mucosa ein Mitverursacher dieser Nebenwirkungen (Kobayashi *et al.*, 1999), Ikegami *et al.*, 2002; Hecht, 1998).

2.1.2.2 Metabolismus von Irinotecan

Der Metabolismus von Irinotecan (CPT-11) ist sehr komplex und stand in den letzten Jahren oft im Mittelpunkt der Irinotecan-Forschung (Mathijssen *et al.*, 2001; Rivory *et al.*, 2000, Slatter *et al.*, 1997). Eine Übersicht über die wichtigsten metabolischen Abläufe des Irinotecans ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

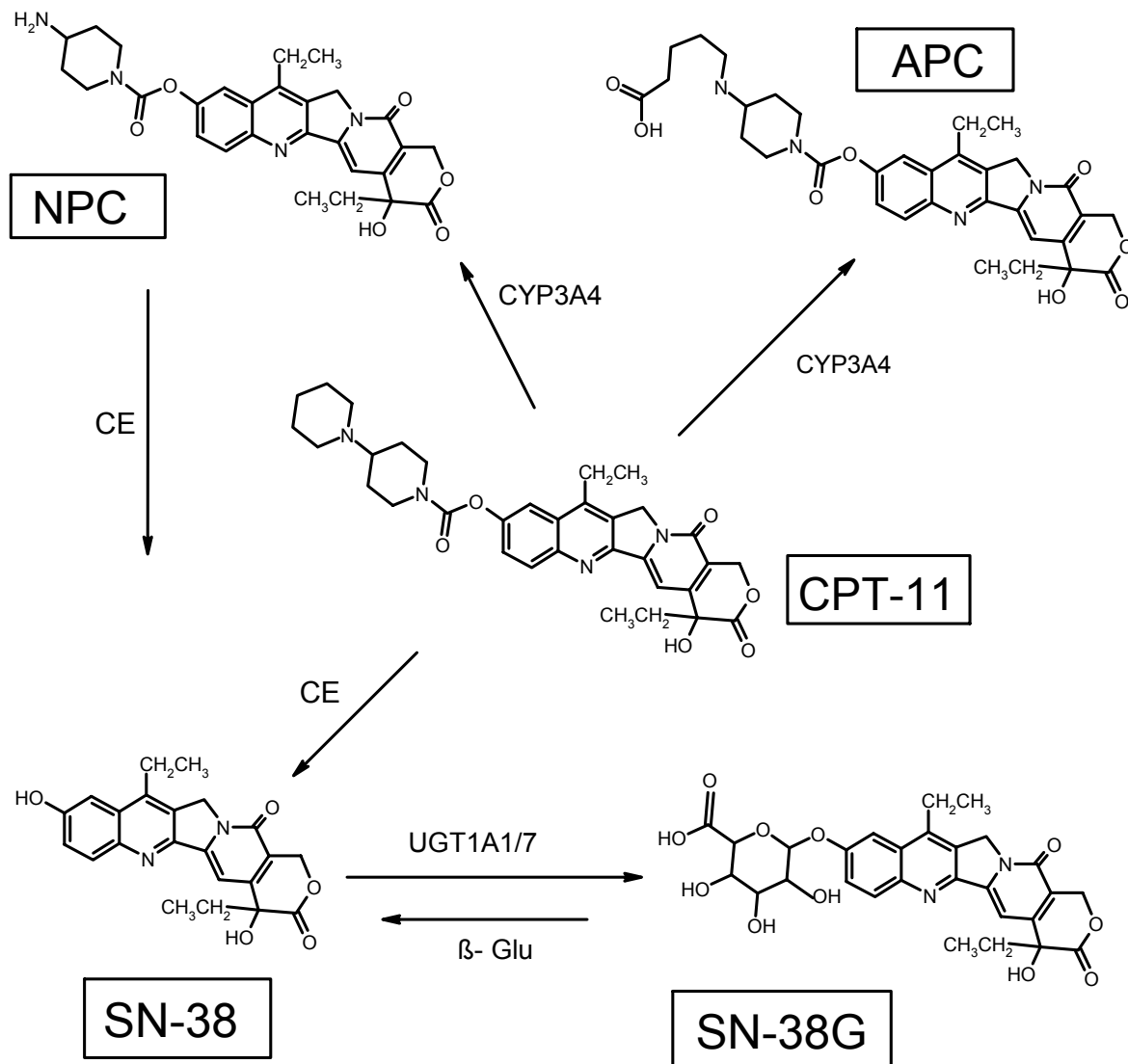


Abb. 2.1: Metabolismus von Irinotecan; CE = Carboxylesterase, β-Glu = β-Glucuronidase, UGT = UDP-Glucuronyltransferase; CYP = Cytochrom-P450 (nach Mathijssen *et al.*, 2001).

Bei Irinotecan handelt es sich um ein Prodrug mit einem Piperidiny-Piperidino-Rest an der C-10-Position des Camptothecin Moleküls. Die Abspaltung dieser Seitenkette durch die endogene Carboxylesterase (CE) (Khanna *et al.*, 2000) ist notwendig, um den aktiven Metaboliten SN-38 zu bilden, der für die Inhibition der Topoisomerase I

(s. Kap. 2.1.2.3) verantwortlich ist. Die Konversion von Irinotecan in SN-38 erfolgt im Blut, in der Leber und zum Teil auch durch lokale Aktivierung im Tumorgewebe.

Die Ausscheidung von Irinotecan erfolgt vorwiegend über eine Glucuronidierung des aktiven Metaboliten SN-38 zu SN-38-Glucuronid (SN-38-G), die in der Leber stattfindet. Die UDP-Glucuronyltransferasen 1A1 und 1A7 (UGT1A1/7) (Hanioka *et al.*, 2001; Gagné *et al.*, 2002) sind die hauptverantwortlichen Isoenzyme für diesen Metabolisierungsschritt. Der glucuronidierte Metabolit ist um den Faktor 50 - 100 schwächer wirksam als unverändertes SN-38.

Zusätzlich zur Glucuronidierung kann eine Deglucuronidierung durch β -Glucuronidasen (β -Glu) im Darm stattfinden, wodurch es zu einer schweren Schädigung der Darmzellen und dadurch verursachte Diarrhöen (Ikegami *et al.*, 2002) kommen kann (s. Kap. 2.1.2.1).

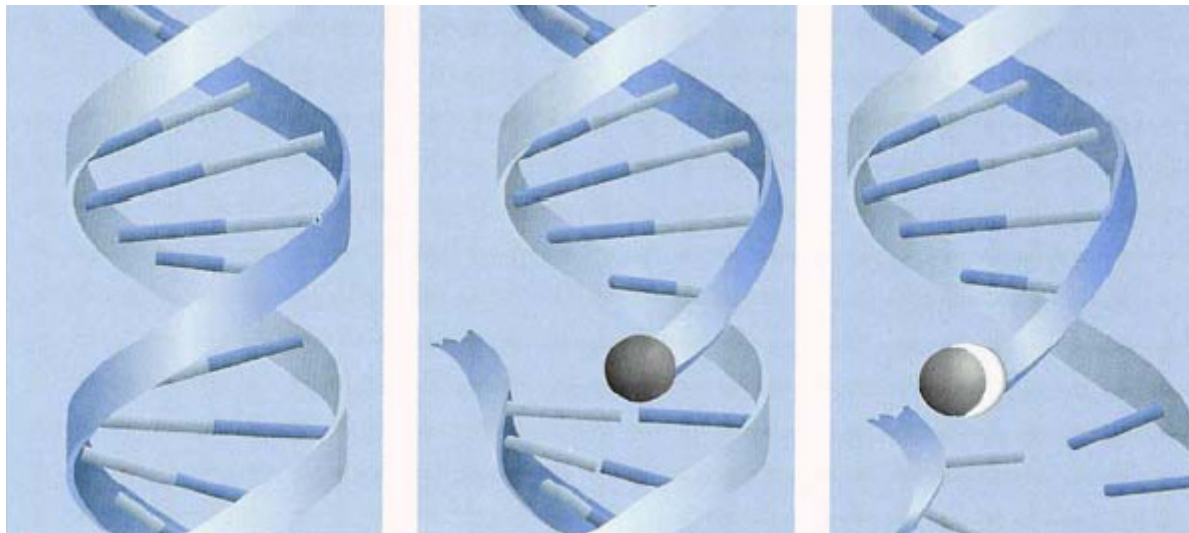
Irinotecan unterliegt außerdem einem CYP3A4-vermittelten oxidativen Metabolisierungsprozess (Hanioka *et al.*, 2002), wobei zwei weitere Metaboliten (APC und NPC) gebildet werden. NPC kann durch eine Carboxylesterase auch weiter zu SN-38 hydrolysiert werden (Dodds *et al.*, 1998).

2.1.2.3 Wirkungsmechanismus

Irinotecan und sein viel aktiverer Metabolit SN-38 hemmen die Topoisomerase-I. Die Topoisomerase-I ist ein Enzym, das im Zellkern lokalisiert ist. Dort tritt es mit der DNA in Wechselwirkung und bewirkt kurzfristige Einzelstrangbrüche. Der stark aufgeknäuelte DNA-Doppelstrang wird so entwunden und in zwei Einzelstränge getrennt (Koolmann, 1998). Hierbei bleiben die Bruchstücke aber über Proteinbrücken miteinander verbunden, und der DNA-Strang kann durch die DNA-Polymerasen kopiert werden. Die Topoisomerase-I spaltet das Phosphodiester-Rückgrat des DNA-Stranges. Ein Tyrosin-Rest des Enzyms und das 3'-Phosphatende der DNA bilden ein Intermediärprodukt, welches zur Relaxation des Stranges führt. Die Topoisomerase-I dissoziiert wieder von der DNA, und die Phosphodiester-Bindung wird wieder aufgebaut. Dieser Schritt ist notwendig, um so wichtige Vorgänge wie die Replikation, Transkription oder Reparatur der DNA durchzuführen (Liu *et al.*, 1989). In Abbildung 2.2 ist die Interaktion zwischen Irinotecan und der Topoisomerase-I dargestellt.

Als Angriffspunkt für das Irinotecanmolekül dient der Komplex aus DNA und der Topoisomerase-I. Nach der Spaltung des DNA-Einzelstranges bindet Irinotecan an diesen Komplex und stabilisiert ihn (Abb. 2C, 2D). Somit wird die Re-Ligation der Einzelstränge verhindert (Verweij *et al.*, 1995). Durch das Fortschreiten der Replikationsgabel und die fehlende Wiederverbindung der Einzelstränge kommt es zu

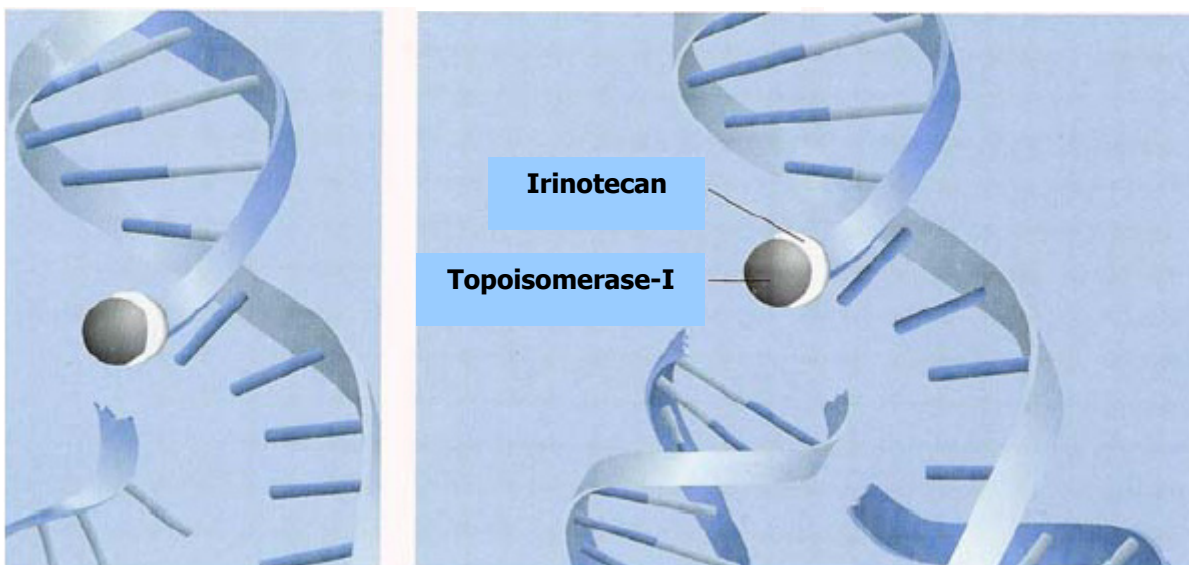
Doppelstrangbrüchen und zu einer irreversiblen Schädigung der DNA. Irinotecan als Topoisomerase-I-Hemmer wirkt zellzyklusspezifisch. Damit sich die Zytotoxizität entfalten kann, muss sich die Zelle in der S-Phase des Zellzyklus befinden (Mathijssen *et al.*, 2002).



A: DNA

B: Topoisomerase-I verursacht einen Einzelstrangbruch.

C: Irinotecan verhindert die Zusammenführung des Strangs.



D: Die Replikation der DNA schreitet voran.

E: Durch die Bindung von Irinotecan an das Protein wird die DNA-Replikation unterbrochen. Die Zelle stirbt ab.

Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von Irinotecan (modifiziert nach Pause, 2004).

Sowohl Irinotecan als auch SN-38 liegen in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zweier Zustandsformen vor: Einer aktiven Lacton-Form und einer inaktiven

Hydroxy-Form. Es konnte gezeigt werden, daß die biologische Aktivität nur durch den geschlossenen Lacton-Ring hervorgerufen wird (Ikegami *et al.*, 2002). Der geschlossene Lacton-Ring ist auch für die Reaktion mit der Topoisomerase-I und die passive Diffusion in die Zelle hinein notwendig.

2.1.2.4 Pharmakokinetische Eigenschaften

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Irinotecan und seinen beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G wurden in vielen Studien (Mathijssen *et al.*, 2001; Chabot *et al.*, 1995; Slatter *et al.*, 1999) mit immer vergleichbaren Ergebnissen, trotz der hohen interindividuellen Variabilität, untersucht.

Nach Beendigung der Applikation, die in der Regel als kurze Infusion über 0.5 - 1.5 Stunden erfolgt, werden im Plasma die höchsten Konzentrationen an Irinotecan gemessen (Rothenberg *et al.*, 2001), die aber schon kurze Zeit später als Ergebnis der vielfältigen Verteilungs- und Eliminationswege (Sparreboom *et al.*, 1998) rapide abnehmen. In einigen Studien konnte ein kurzzeitiges Wiederanstiegen der Irinotecan-Konzentration, verursacht durch den enterohepatischen Kreislauf der Substanz, beobachtet werden (Chabot *et al.*, 1995).

Die maximale Plasmakonzentration und die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von Irinotecan sind proportional zur verabreichten Dosis, obwohl auch hier mit einer hohen Variabilität zu rechnen ist. Die Proportionalität der beiden Parameter zur verabreichten Dosis indiziert eine lineare Pharmakokinetik für Irinotecan.

Die Konzentrations-Zeit-Profile deuten auf eine mehrphasige Elimination hin, wobei es zu guten Übereinstimmungen mit einem 2-oder 3-Kompartiment-Modell kommt. Die terminale Halbwertszeit von Irinotecan liegt zwischen 9 - 14 Stunden (Mathijssen *et al.*, 2001). Das Verteilungsvolumen beträgt im Mittel 150 l/m^2 und weist damit auf eine hohe Gewebeverteilung hin. Die Gesamtkörper-Clearance liegt bei 15 l/h/m^2 (Robert *et al.*, 1998).

Die terminale Halbwertszeit sowie das Verteilungsvolumen und die Clearance sind unabhängig von der applizierten Dosis, was auf das Vorliegen einer linearen Pharmakokinetik hinweist.

Der aktive Metabolit SN-38 erreicht die höchsten Plasmakonzentrationen, die ungefähr 2.5% der verabreichten Irinotecan-Konzentration darstellen, ca. 1 - 2-Stunden nach Ende der Irinotecan-Infusion. Die terminale Halbwertszeit des Metaboliten wird im Mittel mit 13 Stunden angegeben (Rothenberg *et al.*, 2001), wobei diese immer länger ist, als die der Muttersubstanz.

Die maximalen Plasmakonzentrationen des glucuronidierten Metaboliten werden ebenfalls 1 - 2-Stunden nach Ende der Infusion erreicht und liegen in der Regel

5 - 6-mal höher als die des aktiven Metaboliten. Die mittlere Halbwertszeit des Glucuronids wird mit 13 Stunden angegeben.

2.1.3 Pharmakogenetik

Die Pharmakogenetik befasst sich mit dem Einfluss genetischer Variabilität auf die Arzneimittelwirkung (Roots, 2004). Eines der wesentlichen Ziele ist es, die Auswahl und Dosierung eines Arzneimittels optimal an den individuellen Bedarf eines Patienten anzupassen.

Genetische Variabilität beeinflusst die Wirkung von Arzneimitteln von der Absorption bis zur vollständigen Elimination (Evans, 2003). In Abbildung 2.3 sind die Auswirkungen genetischer Varianten auf die individuelle Arzneimittelwirkung dargestellt. Genetische Variabilität findet man auf Seiten der Pharmakokinetik (Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination) eines Medikamentes sowie der Pharmakodynamik (Medikamenteneffekte).

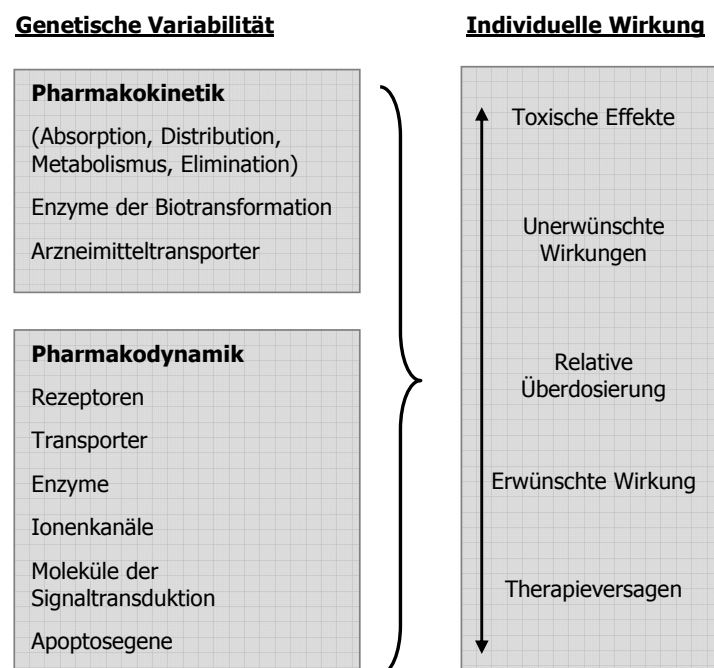


Abb. 2.3: Zusammenspiel pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Strukturen als Ursachen für Variabilität in der Arzneimittelwirkung (Kirchheiner, 2004).

Nahezu alle Enzyme des Fremdstoffmetabolismus weisen genetische Varianten (Polymorphismen) auf, die zu Aktivitätseinschränkung bis hin zum völligen Ausfall führen können (Evans, 1999). Variationen in den Genen von Arzneimitteltransportern beeinflussen die Aufnahme und Verteilung von Fremdstoffen im Organismus.

Genetische Varianten in den Zielstrukturen von Medikamenten, wie Arzneimittelrezeptoren oder intrazellulären Molekülen der Signaltransduktion und Genregulation, haben Auswirkungen auf die molekularen Arzneimitteleffekte.

2.1.3.1 Genetische Polymorphismen im Bereich der Pharmakokinetik

90% aller Polymorphismen liegen als Variationen eines einzelnen Nukleotids (*single nucleotide polymorphism*, SNP) vor (Collins *et al.*, 1998). SNPs werden definiert als Positionen im Genom, an denen sich die DNA bei der Mehrzahl der Individuen in einer einzelnen Base unterscheidet. Hierbei tritt der seltenste Nukleotidaustausch mit einer Häufigkeit von 1% auf (Nussbaum *et al.*, 2001). Die SNP-Frequenz in genomischer DNA beträgt ca. 1/1000 Basenpaare (bp). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Häufigkeit in kodierenden Exons aber um den Faktor vier vermindert ist (Li *et al.*, 1991). Die Unterschiede einzelner Basen zwischen zwei Individuen summieren sich so auf mehrere Millionen Basenpaare in den Genomen und etwa 100 000 Aminosäurenunterschiede in ihren Proteomen.

SNPs können zu Unterschieden in den Konzentrationen von Arzneistoffen und deren Metaboliten im Blut und in den Zielgeweben führen und dadurch die Therapie sowohl positiv als auch negativ beeinflussen.

So können Individuen, die einen genetisch bedingten Unterschied in der Aktivität eines bestimmten Enzyms oder Transporters aufweisen, voneinander abweichende Plasmakonzentrations-Zeitverläufe bei Einnahme desselben Medikamentes zeigen. Es besteht damit die Gefahr, dass es zu einem Therapieversagen oder aber zu einer erhöhten Toxizität kommt. Um die Unterschiede in den Plasmakonzentrationen auszugleichen, müssen somit verschiedene Dosierungen gewählt werden. Die Höhe der Dosisanpassung hängt dabei von den empirisch gefundenen Genotyp-bedingten Unterschieden in der Pharmakokinetik ab.

Die Pharmakokinetik von Arzneimitteln und der Einfluss genetischer Variabilität wird durch pharmakokinetische Kenngrößen wie Plasmakonzentrationen, Clearance, Verteilungsvolumen, Eliminationshalbwertszeit und Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the concentration time curve , AUC) beschrieben.

2.1.3.2 Pharmakogenetik von Irinotecan

Irinotecan weist eine hohe interindividuelle Variabilität seiner Pharmakokinetik auf. Wie in Kapitel 2.1.3.1 erläutert, können genetische Faktoren wesentlich an dieser Variabilität beteiligt sein.

Irinotecan zeigt einen sehr komplexen Metabolismus, an dem viele Enzyme involviert sind (Kap. 2.1.2.2). Das pharmakologische Verhalten von Irinotecan und seinen Metaboliten wird aber zusätzlich durch membranständige Transporterproteine beeinflusst, da diese entscheidend an der Verteilung und Elimination beteiligt sind (Mathijssen *et al.*, 2003).

So spielen z.B. die Transporter P-gp, MRP1, MRP2 und BCRP eine wichtige Rolle bei der Verteilung und Elimination des Irinotecans und seiner beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G. In der Membran der Gallenkanalchen sind die beiden Transporter MRP2 und P-gp für die biliäre Ausscheidung der drei Substanzen verantwortlich. BCRP transportiert vorwiegend SN-38 aus den Tumorzellen und ist damit mitverantwortlich für die Entstehung einer Resistenz.

Alle an der Elimination beteiligten Enzyme und Transporter können Varianten in ihren Genen aufweisen, die für die hohe interindividuelle Variabilität der Pharmakokinetik des Irinotecans verantwortlich sind (Toffoli *et al.*, 2003).

Die für diese Studie relevanten Gene und SNPs werden im Folgenden dargestellt.

2.1.3.2.1 P-Glykoprotein (P-gp)

Gene der „ATP-binding cassette“ (ABC) Transporter bilden die größte Familie innerhalb der transmembranären Proteine. ABC-Transporter binden und hydrolysieren ATP und nutzen die dabei freiwerdende Energie, um diverse Substrate durch biologische Membranen zu transferieren. Pharmakokinetische Untersuchungen ergaben, dass ABC-Transporter an der Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung vieler Arzneistoffe mitwirken (Kerb *et al.*, 2001).

P-Glykoprotein, das Genprodukt des MDR1-Gens (ABCB1), ist der am besten charakterisierte Transporter für Arzneistoffe mit einem sehr breiten Substratspektrum. Unter den Transportsubstraten finden sich zahlreiche Arzneistoffe, die in unterschiedlichen Indikationen Anwendung finden. Eine Reihe von Zytostatika werden durch P-gp transportiert, weswegen dieser Carrier auch ursprünglich als wichtiger Auslöser der *multidrug resistance* (MDR) identifiziert wurde (Lockhardt *et al.*, 2003). P-gp ist hauptsächlich am apikalen Pol epithelialer Zellen lokalisiert. Somit ist der Transport von P-gp-Substraten von basolateral nach apikal gerichtet. Dies kann für Arzneimittel, die von P-gp transportiert werden, weitreichende Konsequenzen bezüglich der Aufnahme, Verteilung und Elimination haben.

In einer Studie von Iyer *et al.* (2002) mit Knock-out Mäusen konnte demonstriert werden, dass P-gp zu 50% an der Ausscheidung von Irinotecan, nicht aber seiner

Metaboliten beteiligt ist. Polymorphismen im MDR1-Gen können die Expression des Carriers verändern und damit auch den Transport des Irinotecans beeinflussen. Bisher konnten 50 SNPs im MDR1-Gen nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2006). Einige davon, wie z.B. der C3435T-SNP, der bei 48% der kaukasischen Bevölkerung auftritt, zeigen einen großen Einfluss auf die Transportaktivität des Carriers.

In einer Studie von Mathijssen *et al.* (2003) wurde der Einfluss dreier SNPs des MDR1-Gens, darunter die SNPs C1236T und C3435T auf die Pharmakokinetik des Irinotecans untersucht. Die Untersuchung hat ergeben, dass der C3435T-SNP keine Auswirkungen auf den Transport des Irinotecans zu haben scheint, während der C1236T-SNP zu einer veränderten Pharmakokinetik führt. Die homozygoten Träger der Mutation zeigten signifikant höhere AUC-Werte für Irinotecan und SN-38 als die Träger des Wildtyps. Des Weiteren war die Clearance der Lacton-Form des SN-38 signifikant erniedrigt bei den Trägern der Mutation.

2.1.3.2.2 Organisches Anionen-Transport-Polypeptid (OATP)

Die Transporter der OATP-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Verteilung von Substanzen im Körper, da sie die zelluläre Aufnahme von körpereigenen und körperfremden Stoffen beeinflussen. Sie sind z.B. für die Aufnahme von amphipathischen organischen Stoffen (Gallensäuren, Steroidhormone, Eicosanoide, kleine Peptide und verschiedene Arzneistoffe) verantwortlich.

Aktuell sind 11 Transporter der OATP-Superfamilie bekannt, die in unterschiedlichen Geweben, wie Leber, Niere, Gehirn und im Darm exprimiert werden (Marzolini *et al.*, 2004).

Der OATP-C-Transporter (auch OATP1B1 genannt) ist ein leberspezifischer Transporter der OATP-Familie. Er ist an der sinusoidalen Plasmamembran der Hepatozyten lokalisiert, wo er für die Aufnahme von Arzneistoffen aus dem portalen Blut in die Leberzellen verantwortlich ist und damit den ersten Schritt bei der Arzneimittelimination vermittelt. Bedingt durch seine Leberspezifität und die Fähigkeit viele verschiedene Substanzen zu transportieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass Polymorphismen in den Genen des OATP-C-Transporters die hepatische Arzneistoffelimination beeinflussen. Bisher konnten verschiedene SNPs im Gen des OATP-C-Transporters nachgewiesen werden, von denen einige eine signifikante Verringerung der Transportleistung gegenüber bestimmten Wirkstoffen zeigten (Tirona *et al.*, 2001; Nozawa *et al.*, 2002).

In einer *in vitro*-Studie von Nozawa *et al.* (2005) wurde untersucht, inwieweit der OATP-C-Transporter an der Elimination des Irinotecans und seiner beiden

Metaboliten SN-38 und SN-38-G beteiligt ist, und welchen Einfluss SNPs in den Genen des OATP-C-Transporters auf eine eventuell vorliegende Transportaktivität haben.

Es konnte festgestellt werden, dass nur der aktive Metabolit SN-38 transportiert wird, wobei der Transport wahrscheinlich in beide Richtungen, aus der systemischen Zirkulation in die Leber und umgekehrt, möglich ist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass einige der in der Studie untersuchten SNPs zu Unterschieden in der Transportaktivität in Bezug auf den aktiven Metaboliten SN-38 führen.

```

Exon 4
421 ggtgttttga ctgctttgcc acatttcttc atgggatatt acaggtattc taaagaaact

A388G (N130D)
481 aatatcaatt catcagaaaa ttcaacatca accttatcca ctgttttaatt taatcaaatt
    g
    a
    a
    g

Exon 5
541 ttatacactca atagagcatc aactgagata gtgggaaaag gttgttttaa ggaatctggg

T521C (V174A)
601 tcatacatgt ggatatatgt gttcatgggt aatatgcttc gtggaatagg ggagactccc
    t
    t
    c
    c

661 atagtaccac tggggccttc ttacattgat gattttgcta aagaaggaca ttcttctttg

Exon 6
721 tatttaggta tattgaatgc aatagcaatg attggtccaa tcattggcct tacctggga

G721A (D241N)
781 tctctgtttt ctaaaatgta cgtggatatt ggatatgttg atctaa OATP-C*1a
    g OATP-C*1b
    a OATP-C*1c
    g OATP-C*5
    g OATP-C*15

```

Abb. 2.4: Sequenz des humanen OATP-C Allels (modifiziert nach Nozawa et al., 2002).

In Abbildung 2.4 ist die OATP-C cDNA-Sequenz dargestellt, die die untersuchten SNPs enthält. Die Bezeichnung OATP-C*1a steht für den Genotyp des unveränderten

Allels, die anderen Bezeichnungen weisen auf das Vorliegen eines Polymorphismus hin. Zum Beispiel enthält das OATP-C*1b-Allel im Unterschied zum Wildtyp an der Position 388 der Sequenz ein Guanin anstelle des eigentlich vorkommenden Adenins. Die Bezeichnung OATP-C*15 kennzeichnet das gleichzeitige Vorliegen der SNPs OATP-C*1b und OATP-C*5 auf einem Allel.

Der Transport von SN-38 wird in der oben genannten Studie bei Vorliegen der Doppelmutation (OATP-C*15) signifikant verringert. Für die anderen in dieser Studie untersuchten Polymorphismen konnte eine ähnliche Tendenz festgestellt werden, die allerdings nicht signifikant war.

2.1.3.2.3 UDP-Glucuronyltransferasen (UGT)

UGT sind eine Superfamilie von Phase-II-Detoxifikationsenzymen, die im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. Aufgrund von Sequenzhomologien unterscheidet man Familie 1 (UGT1A) und Familie 2 (UGT2A) Genprodukte. Die katalytische Konversion von hydrophoben Substraten zu hydrophileren Glukuroniden durch UGT ermöglicht erst die renale und biliäre Elimination einer Vielzahl organischer Substanzen. Dazu zählen metabolische Intermediärprodukte, Pharmaka, Umwelt- sowie Nahrungskarzinogene und Hormone. Menschliche UGT nehmen infolgedessen eine zentrale Rolle in der Homöostase und metabolischen Zytoprotektion ein. Sie eliminieren durch S-, O- oder N-gebundene Glukuronidierung auf der einen Seite direkt ihre spezifischen Substrate, aber glukuronidieren und detoxifizieren andererseits auch Verbindungen, die durch vorangegangenen oxidativen Phase-I Stoffwechsel (z.B. durch mikrosomale Cytochrom P450 Monoxygenasen) zu radikalen Sauerstoffspezies konvertiert wurden. Mit wenigen Ausnahmen sind die resultierenden Glukuronide inaktiv (Testai, 2001).

Die UDP-Glucuronyltransferase 1A1 spielt eine wichtige Rolle bei der Elimination des Irinotecans. Durch die Glucuronidierung wird der aktive Metabolit SN-38 in eine wasserlöslichere Form umgewandelt und kann dadurch anschließend aus der Leber mit der Galle in den Darm transportiert und auf diesem Wege aus dem Körper ausgeschieden werden (Slatter *et al.*, 2000). UGT1A1 ist damit ein wesentlicher Faktor zur Entgiftung von Irinotecan.

Die Glucuronidierung des SN-38 wurde in den letzten Jahren sehr gezielt untersucht, da ein Polymorphismus im UGT1A1-Gen für eine Erhöhung der irinotecan-induzierten Toxizitäten, im speziellen die Neutropenie und die verzögerte Diarrhö, verantwortlich gemacht wird (Tukey *et al.*, 2002; Ando *et al.*, 2000; Rouits *et al.*, 2004; Marcuello *et al.*, 2004; Nagar *et al.*, 2006).

Bei Vorliegen des Polymorphismus, der im Promotor des UGT1A1-Gens liegt, wird das

UGT1A1-Enzym vermindert exprimiert. Dadurch sinkt die hepatische Glucuronidierungsaktivität mit der Folge, dass die Konzentration an SN-38 im Plasma ansteigt, wodurch das Auftreten einer erhöhten Toxizität erklärt werden kann.

Im Normalfall besteht der Promotor des UGT1A1-Gens - auch „TATA-Box“ genannt – aus einem TA-Hexamer, das bedeutet, dass sechs Wiederholungen der Basen Thymin und Adenin vorliegen (Sequenz: A(TA)₆TAA, Genotyp: 6/6). Beim homozygoten Vorliegen der Mutation ist in beiden Allelen des Gens ein zusätzlicher TA-Repeat enthalten, so dass ein Heptamer mit der Sequenz A(TA)₇TAA (Genotyp: 7/7) vorliegt, heute als UGT1A1*28 bezeichnet.

Etwa 11% aller Europäer haben den Genotyp 7/7, 55% den Genotyp 6/7 und 34% den Genotyp 6/6 (Lampe *et al.*, 1999).

Ando *et al.* (2000) zeigten in einer retrospektiven Studie an 118 Personen, dass Patienten mit der Promotorstruktur 6/6 signifikant weniger an schweren Toxizitäten leiden, als Patienten mit anderen Promotorstrukturen:

Demnach leidet mehr als die Hälfte aller Patienten des Genotyps 7/7 unter schweren bis lebensbedrohlichen Nebenwirkungen des Irinotecan, während nur 15% aller Patienten des Genotyps 6/6 von schweren Nebenwirkungen betroffen sind.

Diese These konnte durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden. Jedoch liefern die Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen der verschiedenen Arbeitsgruppen widersprüchliche Resultate. In einer Studie von Iyer *et al.* (2002a) gab es z.B. einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Genotyp 7/7 und dem Auftreten schwerer Diarrhöen. Rouits *et al.* (2004) konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Mutation und dem Auftreten schwerer Neutropenien erkennen, wobei es aber hier keinen Zusammenhang mit dem Auftreten schwerer Diarrhöen gab.

2.1.4 Zielsetzung und Fragestellungen

Irinotecan ist eine gegen verschiedene Tumorentitäten wirksame Substanz, die häufig in der First-line-Standardtherapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird. Das empirische Vorgehen, die Dosis anhand der Körperoberfläche der Patienten zu berechnen, führt zu einer hohen Variabilität der pharmakologischen Wirkungen bei einzelnen Patienten.

Da pharmakokinetische und pharmakogenetische Parameter sowie individuelle Patientenfaktoren die Wirksamkeit oder Toxizität eines Zytostatikums entscheidend beeinflussen, sollten diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Im Focus der Studie stand dabei der pharmakogenetische Aspekt. Es sollte der Einfluss ausgewählter SNPs auf die Pharmakokinetik des Irinotecans und seiner

beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G untersucht werden.

Ein Teil der dabei betrachteten SNPs wurde bereits in einigen Studien auf eine Korrelation mit der Pharmakokinetik hin überprüft, wobei jedoch unterschiedliche, z.T. widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden. Die Untersuchung dieser Polymorphismen innerhalb der hier dargestellten Studie sollte der Überprüfung und Bestätigung der bereits ermittelten Daten dienen.

Der weitere Teil der betrachteten SNPs wurde bisher nur in *in vitro*-Untersuchungen auf eine Korrelation mit der Irinotecan-Transportaktivität hin analysiert. Der Einfluss dieser SNPs auf die Pharmakokinetik des Irinotecans sollte, innerhalb der hier dargestellten Studie, erstmalig an einem Patientenkollektiv untersucht werden.

Die ermittelten Ergebnisse sollten dann auf Zusammenhänge mit den beobachteten klinischen Effekten geprüft und gegebenenfalls als Grundlage für die Entwicklung von Dosierungsrichtlinien dienen.

Dieses Ziel sollte durch folgendes Vorgehen erreicht werden:

- Untersuchung der pharmakokinetischen Parameter von Irinotecan und seinen beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G
- Genotypisierung der Patienten auf die ausgewählten SNPs
- Untersuchungen zur Korrelation zwischen pharmakokinetischen und pharmakogenetischen Parametern
- Charakterisierung der Toxizität nach Applikation von Irinotecan
- Ermittlung der interindividuellen Variabilität und Identifizierung patientenspezifischer Einflussfaktoren auf pharmakokinetische Parameter
- Untersuchungen zur Korrelation zwischen Pharmakokinetik bzw. -genetik und klinischen Effekten.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Material

Eine Aufstellung aller verwendeten Geräte und Chemikalien findet sich im Anhang dieser Arbeit.

2.2.2 Analytik von Irinotecan

2.2.2.1 Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Plasmaproben mittels Plasmaproteinfällung erfolgte in Anlehnung an die von Poujol *et al.* (2003) entwickelte Methode.

Da der Standard für das SN-38-Glucuronid nicht zur Verfügung stand, wurde der Metabolit im Plasma der Patienten durch eine indirekte Methode (Chester *et al.*, 2003; de Bruijn *et al.*, 1997) nachgewiesen.

Die Plasmaproben wurden dazu für jeden Abnahmezeitpunkt einmal mit und einmal ohne Zugabe von β -Glucuronidase aufgearbeitet.

Probenaufarbeitung ohne β -Glucuronidase

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Plasmaproben wurden für 5 Minuten im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Anschließend wurden $250\text{ }\mu\text{l}$ des Plasmas in $250\text{ }\mu\text{l}$ des eiskalten Reaktionsstoppers, pH 3 (Kap. 5.2.2) pipettiert und für 20 Sekunden gut geschüttelt. Die Proben wurden dann für 20 Minuten im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und danach für mindestens 12 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, um das gefällte Protein nach dem Einfrieren besser abtrennen zu können. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Plasmaproben für 5 Minuten im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und vor dem 10-minütigen Zentrifugieren bei $14\ 000\ g$ für weitere 10 Minuten im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und der HPLC-Analytik zugeführt (Kap. 2.2.2.2).

Probenaufarbeitung mit β -Glucuronidase

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Plasmaproben wurden für 5 Minuten im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Im Anschluss wurden $250\text{ }\mu\text{l}$ Plasma mit $10\text{ }\mu\text{l}$ β -Glucuronidase ($1000\text{ U}/10\text{ }\mu\text{l}$) versetzt und für eine Stunde im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden dem Plasma- β -Glucuronidase-Ansatz $240\text{ }\mu\text{l}$

Reaktionsstopper, pH 3 (Kap. 5.2.2) zugesetzt und das Ganze für 20 Sekunden gut geschüttelt. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte analog zu der oben beschriebenen Aufarbeitung ohne β -Glucuronidase.

2.2.2.2 HPLC-Analytik

Die Quantifizierung der drei Analyten im Plasma im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels HPLC-Analytik modifiziert nach Poujol *et al.* (2003) durchgeführt.

HPLC-System:	Waters™ 600 Pumpe, Autosampler Waters™ 717 plus, Waters™ 474 Scanning Fluorescence Detector, Waters™ 600 Controller, Integrator EZChrom™ Elite Software, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA)		
Stationäre Phase:	LiChrocart® Superspher 60 RP-select B column, 250 mm x 3 mm, Partikelgröße 5 μ m, Fa. Merck, LiChrocart® LiChrospher® 60 RP-select B guard column, 4 mm x 4 mm		
Mobile Phase:	100 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer mit 1 mM Natriumheptansulfonat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 4.0 (eingestellt mit 10% H ₃ PO ₄)/Acetonitril 77:23 (v/v)		
Detektion:	1-10 min:	λ :	Ex: 485 nm Em: 542 nm
	10-30 min:	λ :	Ex: 359 nm Em: 536 nm
	30-35 min :	λ :	Ex: 485 nm Em: 542 nm
Detektoreinstellungen:	Gain: 1000, Attenuation: 64, Resp.: 10 sec		
Flussrate:	0.5 ml/min		
Injektionsvolumen:	20 μ l		
Retentionszeiten:	SN-38-G:	4.8 \pm 0.2 min	
	Irinotecan:	16.9 \pm 0.4 min	
	SN-38:	26.2 \pm 0.5 min	
Begasung:	5 ml/min		

Der Phosphatpuffer wurde filtriert (Porendurchmesser 0.45 μ m) und nach Zugabe des Acetonitrils in einem Ultraschallbad für 15 Minuten entgast.

Zum Schutz der HPLC-Säule vor Verschmutzung mit nicht-gefällten

Proteinbestandteilen und Phosphatpuffer-Kristallen, wurde die Säule alle acht Injektionen für 30 Minuten gespült. Das Fließmittel bestand dabei aus einem Gemisch aus Acetonitril/*Aqua bidest.* 77:23 (v/v). Während dieses Spülprogramms wurden 20 µl eines Gemisches bestehend aus Acetonitril/*Aqua bidest.* 50:50 (v/v) injiziert. Nach dem Spülen wurde die Säule vor Einspritzen neuer Plasmaproben für 30 Minuten mit der mobilen Phase equilibriert.

2.2.2.3 Kalibrierung

Für die Bestimmung der Irinotecan- und SN-38-Konzentrationen im Plasma wurde vor jeder Messung eine matrixadaptierte Kalibrierung durchgeführt.

Herstellung der Stamm- und Arbeitslösungen

Zur Durchführung einer quantitativen Bestimmung mussten zunächst Stamm- und Arbeitslösungen der beiden zu untersuchenden Analyten hergestellt werden. Die Stammlösung von Irinotecan wurde aus dem Fertigarzneimittelpräparat Campto® 20 mg/ml (Pfizer) hergestellt, indem das Fertigarzneimittel 1:1 mit DMSO verdünnt wurde. Die entstandene Stammlösung hatte eine Konzentration von 10 mg/ml. Die Stammlösung von SN-38 wurde durch exakte Einwaage von 10 mg Reinsubstanz in einen 10 ml fassenden Messkolben und Auffüllung mit DMSO hergestellt. Die Konzentration für SN-38 in der Stammlösung betrug somit 1 mg/ml. Die erhaltenen Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Benutzung gelagert.

Ausgehend von den beiden angefertigten Stammlösungen wurden dann die benötigten Arbeitslösungen (AL) durch Verdünnen mit DMSO hergestellt. Für Irinotecan wurden Arbeitslösungen der Konzentrationen 100, 50, 25, 2.5, 1.25, 0.25, 0.125 und 0.0625 µg/ml hergestellt und für SN-38 wurden Arbeitslösungen mit 10 000, 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 25 und 12.5 ng/ml angefertigt. Auch diese Lösungen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Bei allen Lösungen wurde auf einen ausreichenden Lichtschutz geachtet.

Herstellung der Kalibratorlösungen

Für die matrixadaptierte Kalibrierung wurde der jeweilige Kalibrator aus der entsprechenden Arbeitslösung und analytenfreier Matrix nach folgendem Pipettierschema hergestellt (Tab. 2.1). Die Aufarbeitung der Leermatrix, die von gesunden Probanden gewonnen wurde, entsprach der in Kapitel 2.2.2.1. beschriebenen Probenaufarbeitung.

Die Kalibratorreihe wurde mittels HPLC (Kap. 2.2.2.2) quantifiziert. Aus den bei der Mehrfachbestimmung ($n = 6$) erhaltenen Mittelwerten wurden mittels linearer Regression für jeden Analyten eine Kalibriergerade erstellt, die zur Berechnung der Irinotecan- und SN-38-Konzentrationen der vermessenen Proben dienen.

Tab. 2.1: Herstellung der Kalibratoren für die quantitative Bestimmung von Irinotecan und SN-38 im Plasma.

Kalibrator	Plasma [μ l]	AL* CPT-11 (μ l) [verwandte AL in μ g/ml]	AL* SN-38 (μ l) [verwandte AL in ng/ml]	Konzentration CPT-11 (ng/ml)	Konzentration SN-38 (ng/ml)
1	230	10 [0.0625]	10 [12.5]	2.5	0.5
2	230	10 [0.125]	10 [25]	5	1
3	230	10 [0.25]	10 [62.5]	10	2.5
4	230	10 [1.25]	10 [125]	50	5
5	230	10 [2.5]	10 [250]	100	10
6	230	10 [25]	10 [500]	1 000	20
7	230	10 [50]	10 [1000]	2 000	50
8	250	0	0	0	0

* AL = Arbeitslösung

2.2.3 Genotypisierung

Bei der Genotypisierung wird die genomische DNA der Patienten auf genetische Varianten und Polymorphismen hin untersucht, die für individuelle Unterschiede im Arzneistoffmetabolismus oder –transport verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus dem Blut der Patienten deren DNA extrahiert. Der zu untersuchende Genabschnitt wurde anschließend mittels der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und zur Untersuchung der SNPs C3435T, A388G, G721A und der Doppelmutation OATP-C*15 mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut. Im Anschluss wurden die erhaltenen spezifischen Fragmente elektrophoretisch analysiert, um gegebenenfalls vorhandene SNPs zu detektieren.

2.2.3.1 Isolierung der DNA

Für die Untersuchung der Pharmakogenetik wurden pro Patient 3 ml venöses Blut zur DNA-Extraktion benötigt. Die DNA wurde dabei mit dem Gentra Puregene Blood kit[®] aus dem Gesamtblut gewonnen. Zur Durchführung der Lyse der roten Blutzellen wurden 3 ml Blut und 9 ml RBC Lysis Solution[®] in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, geschüttelt und 10 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde bei 2000 *g* für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand über dem weißen Zellpellet bis auf ca. 100 µl verworfen. Danach wurde 30 sec geschüttelt, um die Leukozyten in dem restlichen Überstand zu resuspendieren. Anschließend wurden 3 ml Cell Lysis Solution[®] zu den resuspendierten Leukozyten pipettiert, dabei wurde der Gesamtansatz mehrmals auf und ab pipettiert, um die sedimentierten Zellen zu lösen. Bildeten sich in diesem Arbeitsschritt Zellaggregate aus, wurde der Ansatz bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, um eine homogene Probe zu erhalten. Anschließend wurden 15 µl RNase A Solution[®] zum Zelllysat hinzugefügt, geschüttelt und bei 37 °C im Wasserbad für 15 - 60 Minuten inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur wurde die Proteinfällung durchgeführt, indem 1 ml Protein Precipitation Solution[®] zum Zelllysat hinzugefügt, bei hoher Geschwindigkeit für 20 sec geschüttelt und für 10 Minuten bei 2000 *g* zentrifugiert wurde. Das gefällte Protein ergab ein dichtes braunes Pellet. Der Überstand, der die DNA enthielt, wurde in ein sauberes 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 3 ml Isopropanol 100% (v/v) pipettiert und vorsichtig 50-mal auf und ab geschüttelt, bis die DNA ein weißes sichtbares Aggregat bildete. Im Anschluss wurde für 3 Minuten bei 2000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das weiße DNA-Pellet mit einem Präzisionswischtuchzipfel vorsichtig getrocknet. In einem folgenden Schritt wurde die DNA mit 3 ml Ethanol 70% (v/v) vorsichtig gewaschen und danach bei 2000 *g* für 1 Minute zentrifugiert. Der Ethanol wurde danach vorsichtig abpipettiert, um das Pellet nicht zu beschädigen. Das Röhrchen wurde abermals mit einem Präzisionswischtuchzipfel getrocknet und das Pellet für 10 - 15 Minuten an der Luft getrocknet. Zur DNA-Hydratation wurden dem Pellet 250 µl DNA Hydration Solution[®] hinzugefügt bei Raumtemperatur 10 - 12 Stunden gelagert, kurz zentrifugiert und in sterile 500 µl Reaktionsgefäße aliquotiert. Die fertigen DNA-Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

2.2.3.2 Analyse von Reinheit und Ausbeute der isolierten DNA

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte spektralphotometrisch (Schrimpff, 2002). Die Absorption der extrahierten DNA, die zur Messung im Verhältnis 1:20 mit Hydratationspuffer[®] (Gentra Puregene Blood kit[®]) verdünnt wurde, wurde gegen einen Leerwert bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen. Die Konzentration der DNA wurde anschließend aus der Absorption bei 260 nm berechnet. Eine Absorption von $A_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml DNA. Für genaue Messungen soll A_{260} zwischen 0.1 - 1.0 liegen.

Zur Überprüfung der Reinheit wurde ein Absorptionsspektrum zwischen 220 nm und 320 nm aufgenommen. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit. Reine DNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, während Proteine bei 280 nm absorbieren. Gut gereinigte DNA weist Werte im Bereich von 1.7 - 1.9 auf.

2.2.3.3 Amplifizierung der isolierten DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine *in-vitro*-Technik, die die gezielte Amplifizierung von DNA-Abschnitten erlaubt (siehe Abb. 2.5) und damit auch die Identifizierung von SNPs ermöglicht.

In diesem Kapitel wird die Durchführung der PCR im Allgemeinen dargestellt. Die Angaben zu den eingesetzten Amplifikationsansätzen und den speziellen Bedingungen für die Amplifizierung der einzelnen Genabschnitte findet man in den jeweiligen Kapiteln (Kap. 2.2.3.6 - 2.2.3.11).

Im Rahmen der PCR werden eine hitzestabile DNA-Polymerase, eine geringe Menge der isolierten doppelsträngigen DNA (Kap. 2.2.3.1), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und zwei einzelsträngige Oligonukleotidprimer in einer geeigneten Reaktionspufferlösung inkubiert. Die Aufgabe der DNA-Polymerase besteht darin, Primer in 5'-3'-Richtung entlang einsträngiger, denaturierter DNA-Matrizen in Vorwärts- oder Rückwärtsrichtung zu verlängern. Die Sequenzen der dabei entstehenden DNA-Abschnitte sind komplementär zu denen ihrer Matrizen.

Die DNA-Abschnitte werden in einem Thermocycler temperaturgesteuert in Reaktionszyklen amplifiziert. Dabei besteht jeder Zyklus aus drei Schritten (Abb. 2.5). Im ersten Schritt werden beide Stränge der DNA-Doppelhelix durch Temperaturerhöhung getrennt (Denaturierung, 94 °C), woraufhin sich nach Abkühlen auf 50 - 60 °C im zweiten Schritt die Primer komplementär an die entsprechenden

Stellen der einsträngigen DNA-Matrize anlagern können (sog. Annealing). Im dritten Schritt erfolgt bei einer für die Funktion der DNA-Polymerase optimalen Reaktionstemperatur von 68 °C die Verlängerung der Primer (DNA-Synthese). Am Ende dieses Zyklus' liegen neu synthetisierte Doppelstränge vor, die zunächst noch keine definierte Länge haben. Da sie aber im nächsten Zyklus selbst als Matrizen verwendet werden und sie an ihren Enden die Oligonukleotidsequenz der Primer tragen, entstehen praktisch nur noch Produkte gewünschter Länge. Nach 30 Durchläufen liegt die DNA theoretisch 2^{30} -mal vor, allerdings begrenzt bei molarem Überschuss meist die Enzymmenge die Reaktion und damit die Zahl der Zyklen. Darüber hinaus denaturiert die DNA-Polymerase im Laufe der Reaktion, und mit zunehmender Konzentration hybridisieren die gewünschten Stränge auch untereinander. Der letzte Elongationsschritt wird auf mehrere Minuten verlängert, so dass die vollständige Synthese aller Schritte gewährleistet ist.

Alle in der Studie verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Primer“, Version 3.0 für den jeweils kodierenden Bereich ausgewählt und genauer charakterisiert. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Jena Bioscience (Jena).

2.2.3.4 Kontrolle des entstandenen Amplifikationsproduktes mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die erfolgreiche Durchführung der PCR wurde mittels PAGE kontrolliert. Ein Gemisch aus 10 µl PCR-Produkt und 5 µl Probenauftragspuffer (50% (v/v) Glycerin, 0.05% (w/v) Bromphenolblau und 0.05% (w/v) Xylencyanol in TBE-Puffer, pH 8.3; s. Kap. 5.2.2) wurde auf ein 12% Polyacrylamidgel (s. Kap. 5.2.2) aufgetragen. Nach der Elektrophorese (3 h/300 Volt) wurde das Gel in eine Färbeschale überführt, mit *Aqua bidest.* gespült und danach für 15 Minuten in eine Ethidiumbromidlösung (0.05 µg/ml; s. Kap. 5.2.2) gelegt. Zur Entfernung des ungebundenen Farbstoffs wurde das Gel anschließend 10 - 20 Minuten unter mehrmaligem Wechseln der Waschlösung in *Aqua bidest.* gewässert. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden bei 312 nm detektiert und photographisch dokumentiert. Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit einem mitgeführten Längenstandard (PCR Low Ladder Set[®]) bestimmt.

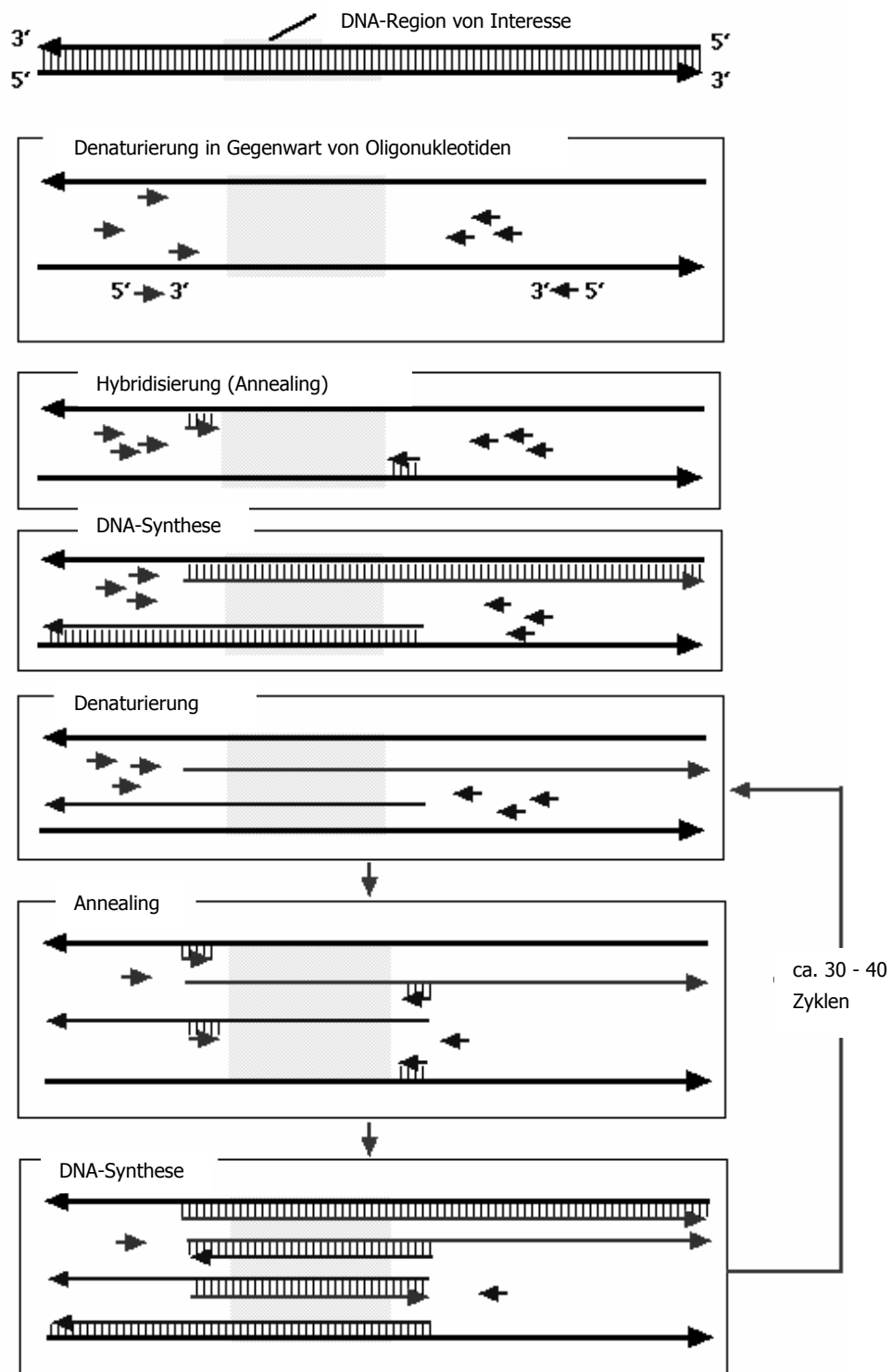


Abb. 2.5: Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerase-Kettenreaktion (modifiziert nach Löffler, 2001).

2.2.3.5 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen-Analyse (RFLP-Analyse)

Die bei der PCR amplifizierte DNA-Stücke für die SNPs C3435T, A388G, G721A und die Doppelmutation OATP-C*15 wurden nach erfolgreicher Identifizierung mittels PAGE (Kap. 2.2.3.4) zum Zweck der RFLP-Analyse mit Restriktionsendonukleasen verdaut.

Restriktionsendonukleasen, auch als Restriktionsenzyme bezeichnet, spalten doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen mit palindromischer Struktur. Punktmutationen in der DNA können dazu führen, dass ursprüngliche Schnittstellen nicht mehr erkannt werden oder zusätzliche Schnittstellen entstehen. Die Detektion unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach dem Verdau durch Restriktionsenzyme wird als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bezeichnet (Mühlhardt, 2003).

Der Restriktionsenzymverdau erfolgte analog den Herstellerangaben für das jeweilige Restriktionsenzym. Ein Ansatz bestand aus 5 µl des entsprechenden Puffers (Zusammensetzung – entsprechend der Herstellerangabe), 1 µl Enzymlösung (10 U/µl) und gegebenenfalls 5 µl BSA. Diesem Gemisch wurden 39 µl PCR-Produkt (Kap. 2.2.3.3) hinzugegeben.

Der Enzymverdau erfolgte im Wasserbad bei der jeweils enzymespezifischen Temperatur für 5 Stunden oder über Nacht entsprechend den Herstellerangaben.

Die resultierenden DNA-Fragmente (10 µl DNA-Verdau + 5 µl Probenauftragspuffer) wurden mittels PAGE (s. Kap. 2.2.3.4) identifiziert. Die entstandenen Restriktionsmuster für die unterschiedlichen Genotypen wurden abgelesen und zu Dokumentationszwecken fotografiert.

2.2.3.6 Polymorphismus C1236T

Der Genabschnitt zur Bestimmung des C1236T-Polymorphismus, der eine ausgewählte Sequenz des Exons 12 des ABCB1-Gens darstellt, enthält keine spezifischen Erkennungsschnittstellen für eine Restriktionsendonuklease, so dass die oben dargestellte RFLP-Analyse in diesem Fall nicht durchgeführt werden konnte. Stattdessen wurde eine recht neue Methode, die *PCR with confronting two pair primers* (PCR-CTPP) nach Hamajima *et al.* (2000) zur Genotypisierung eingesetzt. Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

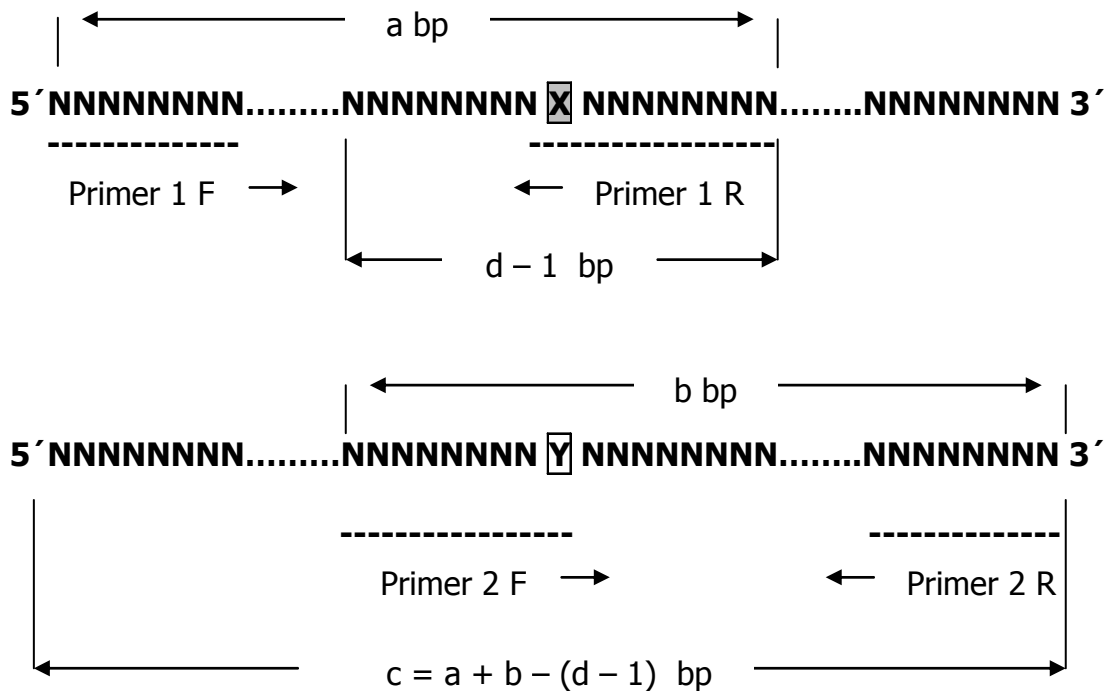


Abb. 2.6: Prinzip der PCR with confronting two pair primers (PCR-CTPP). *a*, Produktgröße für Allel X nach erfolgter Amplifikation; *b*, Produktgröße für Allel Y nach erfolgter Amplifikation; *c*, Produktgröße zwischen Primer 1 F und 2 R; *d*, Produktgröße zwischen Primer 2 F und 1 R (nach Hamajima et al., 2001).

X und Y stellen in der Abbildung die beiden möglichen Allele eines SNPs dar. Für die Durchführung der PCR werden anstelle von einem Primerpaar zwei Primerpaare eingesetzt. Ein Paar für die Amplifikation von Allel X und ein Paar für die Amplifikation von Allel Y. In Primerpaar 1 ist die 3'-Base des so genannten „rückwärts“-Primers komplementär zum Allel X. Daher wird soweit das X-Allel als Genotyp vorliegt auch nur dieses Produkt amplifiziert. In Primerpaar 2 korrespondiert die 3'-Base des so genannten „vorwärts“-Primers mit der Y-Base und daher wird auch nur Allel Y amplifiziert. Alle vier Primer werden für die Amplifikation in einen Reaktionsansatz gegeben.

Liegt der XX-Genotyp bei einem Patienten vor, entstehen Produkte der Größe *a* und *c*. Im Falle des YY-Genotyps entstehen Produkte der Größe *b* und *c*. Bei heterozygoten Trägern findet man Fragmente der Größe *a*, *b* und *c*. Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der PCR-CTPP ist, dass die Primerpaare so gewählt werden, dass unterschiedliche Produktgrößen entstehen, um diese mittels Gelelektrophorese unterscheiden zu können (Kap. 2.2.3.4).

Polymerase-Kettenreaktion

Amplifikationsansatz:

32 µl	PCR-reines Wasser
5 µl	10 x PCR-Puffer für die KOD Hot Start DNA Polymerase®
5 µl	dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM)
2 µl	MgSO ₄ (Endkonzentration 1 mM)
1 µl	Template-DNA
1 µl	3´-Primer I F (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
1 µl	3´-Primer II F (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
1 µl	5´-Primer I R (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
1 µl	5´-Primer II R (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
1 µl	KOD Hot Start DNA Polymerase® (1 U/µl)

Verwendete Oligonukleotide:

Primer I F, 5´-3´:	CTG TGT CTG TGA ATT GCC TTG
Primer I R, 5´-3´:	TCT GCA CCT TCA GGT TCA GA
Primer II F, 5´-3´:	CCT GGT AGA TCT TGA AGG GC
Primer II R, 5´-3´:	TAG CTC GCA TGG GTC ATC T

Temperaturzyklus:

2 min 94 °C, (15 sec 94 °C, 30 sec 64 °C, 30 sec 68 °C), 5 min 68 °C, 30 Zyklen.

Elektrophoresebedingungen zur Identifizierung der entstandenen Amplifikate:

Genauere Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.4. Es wurden folgende DNA-Fragmente detektiert:

CC-Genotyp:	195 + 156 bp
TT-Genotyp:	195 + 79 bp
CT-Genotyp:	195 + 156 + 79 bp

2.2.3.7 Polymorphismus C3435T

Die Bestimmung des C3435T-Polymorphismus erfolgte in Anlehnung an die Methode von Jamroziak *et al.* (2002) mit Modifikationen durch Amplifikation des interessierenden Genabschnitts mittels PCR (Kap. 2.2.3.3), RFLP-Analyse (Kap. 2.2.3.5) und anschließender Gelelektrophorese (Kap. 2.2.3.4).

Polymerase-Kettenreaktion

Zunächst wurde ein spezifischer 208 bp-DNA-Abschnitt, der die 3´- und 5´-Regionen des Exons 26 enthält, amplifiziert.

Amplifikationsansatz:

- 34 µl PCR-reines Wasser
- 5 µl 10 x PCR-Puffer für die KOD Hot Start DNA Polymerase[®]
- 5 µl dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM)
- 2 µl MgSO₄ (Endkonzentration 1 mM)
- 1 µl Template-DNA
- 1 µl 3´-Primer I (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
- 1 µl 5´-Primer II (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
- 1 µl KOD Hot Start DNA Polymerase[®] (1 U/µl)

Verwendete Oligonukleotide:

- Primer I, 5´-3´: TTG ATG GCA AAG AAA TAA AGC
Primer II, 5´-3´: CTT ACA TTA GGC AGT GAC TCG

Temperaturzyklus:

2 min 94 °C, (15 sec 94 °C, 30 sec 54 °C, 30 sec 68 °C), 5 min 68 °C, 30 Zyklen.

Elektrophoresebedingungen zur Kontrolle des entstandenen Amplifikates:

Genauere Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.4. Das entstandene DNA-Fragment ließ eine Länge von 208 bp erkennen.

RFLP-Analyse

Zur Identifizierung dieses Polymorphismus wurde der präamplifizierte DNA-Abschnitt mit dem Restriktionsenzym *Mbo* I verdaut. Der Inkubationsansatz entspricht dem in Kapitel 2.2.3.5 beschriebenen Ansatz. Die Inkubation erfolgte über Nacht (16 h) bei 37 °C im Wasserbad.

Elektrophoresebedingungen zur Identifizierung der Restriktionsmuster:

Genauere Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.4. Es wurden folgende DNA-Fragmente detektiert:

CC-Genotyp: 145 + 63 bp
 TT-Genotyp: 208 bp
 CT-Genotyp: 208 + 145 + 63 bp

2.2.3.8 Polymorphismus A388G

Die Bestimmung des A388G-Polymorphismus erfolgte in Anlehnung an die Methode von Nozawa *et al.* (2002) durch Amplifikation des interessierenden Genabschnitts mittels PCR (Kap. 2.2.3.3), RFLP-Analyse (Kap. 2.2.3.5) und anschließender Gelelektrophorese (Kap. 2.2.3.4). Im Vergleich zu der Methode von Nozawa *et al.* wurden in dieser Arbeit andere Primer ausgesucht, so dass höhere Annealing-Temperaturen während der PCR gewählt werden konnten.

Polymerase-Kettenreaktion

Zuerst wurde ein spezifischer 218 bp-DNA-Abschnitt, der die 3'- und 5'-Regionen des Exons 4 des OATP-C-Gens enthält, mittels PCR amplifiziert.

Amplifikationsansatz:

34 µl PCR-reines Wasser
 5 µl 10 x PCR-Puffer für die KOD Hot Start DNA Polymerase®
 5 µl dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM)
 2 µl MgSO₄ (Endkonzentration 1 mM)
 1 µl Template-DNA
 1 µl 3'-Primer I (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
 1 µl 5'-Primer II (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
 1 µl KOD Hot Start DNA Polymerase® (1 U/µl)

Verwendete Oligonukleotide:

Primer I, 5'-3': GGT GCA AAT AAA GGG GAA TA
 Primer II, 5'-3': CCT TTT CCC ACT ATC TCA GG

Temperaturzyklus:

2 min 94 °C, (15 sec 94 °C, 30 sec 52 °C, 30 sec 68 °C), 5 min 68 °C, 30 Zyklen.

Elektrophoresebedingungen zur Kontrolle des entstandenen Amplifikates:

Genaue Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.4. Das entstandene DNA-Fragment zeigte

eine Bande bei 218 bp.

RFLP-Analyse

Zur Identifizierung dieses Polymorphismus wurde der präamplifizierte DNA-Abschnitt mit dem Restriktionsenzym *Taq* I inkubiert. Der Inkubationsansatz entspricht dem in Kapitel 2.2.3.5 beschriebenen Ansatz. Die Inkubation erfolgte über 5 Stunden bei 65 °C im Wasserbad.

Elektrophoresebedingungen zur Identifizierung der Restriktionsmuster:

Genauere Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.4. Es wurden folgende DNA-Fragmente detektiert:

AA-Genotyp:	145 + 73 bp
GG-Genotyp:	122 + 73 + 23 bp
AG-Genotyp:	145 + 122 + 73 + 23 bp

2.2.3.9 Polymorphismus G721A

Der Nachweis des Single Nucleotide Polymorphismus G721A erfolgte ebenfalls in Anlehnung an die Methode von Nozawa *et al.* (2002), jedoch wurden auch hier andere Primer ausgewählt.

Polymerase-Kettenreaktion

Amplifikationsansatz:

34 µl	PCR-reines Wasser
5 µl	10 x PCR-Puffer für die KOD Hot Start DNA Polymerase [®]
5 µl	dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM)
2 µl	MgSO ₄ (Endkonzentration 1 mM)
1 µl	Template-DNA
1 µl	3'-Primer I (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
1 µl	5'-Primer II (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
1 µl	KOD Hot Start DNA Polymerase [®] (1 U/µl)

Verwendete Oligonukleotide:

Primer I, 5'-3':	GAA CCA TGC ATT CTT GGC ATC TA
Primer II, 5'-3':	CGC ATG TGT GCT TAG AAA GAC G

Temperaturzyklus:

2 min 94 °C, (15 sec 94 °C, 30 sec 56 °C, 30 sec 68 °C), 5 min 68 °C, 35 Zyklen.

Elektrophoresebedingungen zur Kontrolle des entstandenen Amplifikates:

Genauere Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.4. Das entstandene DNA-Fragment ließ eine Länge von 202 bp erkennen.

RFLP-Analyse

Zur Identifizierung dieses Polymorphismus wurde der präamplifizierte DNA-Abschnitt mit dem Restriktionsenzym *Bgl* II inkubiert. Der Inkubationsansatz entspricht dem in Kapitel 2.2.3.5 beschriebenen Ansatz. Die Inkubation erfolgte über 5 Stunden bei 37 °C im Wasserbad.

Elektrophoresebedingungen zur Identifizierung der Restriktionsmuster:

Genauere Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.4. Es wurden folgende DNA-Fragmente detektiert:

GG-Genotyp: 141 + 61 bp
AA-Genotyp: 202 bp
GA-Genotyp: 202 + 141 + 61 bp

2.2.3.10 Doppelmutation OATP-C*15

Zur Bestimmung der Doppelmutation OATP-C*15 (A388G + T521C), welche Nozawa *et al.* (2002) zum ersten Mal beschrieben haben, wurde eine allelspezifische PCR in Anlehnung an die von Nozawa *et al.* (2002) entwickelte Methode durchgeführt, wobei auch hier Teile der Vorschrift modifiziert wurden.

Die auch als *Amplifikation Refractory Mutation System* bezeichnete Variante der PCR ist speziell zur Detektion einer punktuellen Veränderung in der DNA geeignet (Schrimpf, 2002). In zwei getrennten Ansätzen werden verschiedene allelspezifische Primerpaare zum Reaktionsmix hinzugegeben. Der eine Primer der verwendeten Primerpaare ist für beide Ansätze gleich, der andere Primer ist am 3'-Ende entweder für das normale oder für das mutierte Allel (WT- und MT-Primer) spezifisch. Ein PCR-Produkt entsteht nur, wenn Primerpaar und Allel des Templates entsprechend komplementär sind, da die Polymerase den am 3'-Ende nicht vollständig bindenden Primer nicht verlängern kann. Hierfür muss darauf geachtet werden, eine Polymerase ohne Proofreading-Aktivität zu verwenden, da diese sonst den eventuellen Mismatch

ausgleichen würde. Um eine valide Aussage zu erhalten, müssen die Bedingungen für die PCR allerdings sehr stringent, d.h. sehr genau optimiert sein und eingehalten werden.

Im ersten Schritt kann mittels der PCR-Methode (Kap. 2.2.3.3) festgestellt werden, ob der Polymorphismus T521C der Doppelmutation OATP-C*15 vorliegt. Liegt er homozygot vor, so sollte ein entsprechendes Produkt nur mit dem MT-Primer gebildet werden können. Liegt er heterozygot vor, so wird man sowohl ein Produkt mit dem MT-Primer als auch mit dem WT-Primer erhalten.

Im nächsten Schritt kann mittels der RFLP-Analyse (Kap. 2.2.3.5) festgestellt werden, ob zusätzlich zum T521C-Polymorphismus auch noch der A388G-Polymorphismus vorkommt. Nur wenn beide Polymorphismen auf einem Allel zu finden sind, spricht man von der Doppelmutation OATP-C*15.

Polymerase-Kettenreaktion

Amplifikationsansatz:

40.6 µl	PCR-reines Wasser
5 µl	10 x PCR-Puffer für die <i>Taq</i> DNA Polymerase [®] mit 20 mM MgCl ₂ (Endkonzentration 2 mM MgCl ₂)
1 µl	dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM)
1 µl	Template-DNA
1 µl	3'-Primer I OATP-C-WT-Primer <i>oder</i> OATP-C-MT-Primer (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
1 µl	5'-Primer II OATP-C-4-Primer (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
0.4 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase [®] (2 U/µl)

Verwendete Oligonukleotide:

Primer OATP-C-S, 5' - 3':	ATT CAG TGA TGT TCT TA
Primer OATP-C-WT, 5' - 3':	ATA TTA CCC ATG AAC A
Primer OATP-C-MT, 5' - 3':	ATA TTA CCC ATG AAC G

Temperaturzyklus für die Taq DNA Polymerase:

4 min 95 °C, (30 sec 95 °C, 30 sec 46 °C, 2 min 72 °C), 7 min 72 °C, 30 Zyklen.

Elektrophoresebedingungen zur Kontrolle des entstandenen Amplifikates:

Anstelle der PAGE wurde zur Kontrolle des Amplifikates eine Agarose-

Gelelektrophorese mit einem 1.5%-igem Agarosegel (s. Kap. 5.2.2) durchgeführt (10 µl Amplifikat + 5 µl Probenauftragspuffer). Nach der Elektrophorese (100 V, 1 h) wurde das Fragment unter UV-Licht durch Vergleich mit einem Längenstandard (PCR-Step Ladder[®], 50 bp) identifiziert und fotografiert.

Das DNA-Produkt zeigte bei 1945 bp eine Bande.

RFLP-Analyse

Zur Identifizierung des A388G-Polymorphismus wurde der präamplifizierte DNA-Abschnitt, der die Mutation T521C enthält, mit dem Restriktionsenzym *Taq* I inkubiert. Der Inkubationsansatz entspricht dem in Kapitel 2.2.3.5 beschriebenen Ansatz. Die Inkubation erfolgte über 5 Stunden bei 65 °C im Wasserbad.

Elektrophoresebedingungen zur Identifizierung der Restriktionsmuster:

Genauere Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.4. Es wurden folgende DNA-Fragmente detektiert:

Heterozygote Träger des OATP-C*1b- und OATP-C*5-Allels bildeten die Fragmente:
1875 + 47 + 23 bp mit dem WT-Primer und
1875 + 70 bp mit dem MT-Primer.

Heterozygote Träger des OATP-C*1a- und OATP-C*15-Allels bildeten die Fragmente:
1875 + 70 bp mit dem WT-Primer und
1875 + 47 + 23 bp mit dem MT-Primer.

2.2.3.11 Polymorphismus UGT1A1*28

Der Genabschnitt zur Bestimmung des Dinukleotid-Polymorphismus UGT1A1*28, der eine ausgewählte Sequenz der Promoterregion des UGT1A1-Gens darstellt, enthält keine spezifischen Erkennungsschnittstellen für eine Restriktionsendonuklease, so dass die unter Kapitel 2.2.3.5 dargestellte RFLP-Analyse in diesem Fall nicht durchgeführt werden konnte. Es wurde daher eine Methode von Zucker *et al.* (2001) angewendet, in der die Identifizierung des Dinukleotid-Polymorphismus durch Amplifikation des interessierenden Genabschnitts und anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte.

Polymerase-Kettenreaktion

Amplifikationsansatz:

34 µl	PCR-reines Wasser
5 µl	10 x PCR-Puffer für die KOD Hot Start DNA Polymerase®
5 µl	dNTPs (Endkonzentration 0.2 mM)
2 µl	MgSO ₄ (Endkonzentration 1 mM)
1 µl	Template-DNA
1 µl	3´-Primer I (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
1 µl	5´-Primer II (15 pmol/µl, Endkonzentration 0.3 µmol)
1 µl	KOD Hot Start DNA Polymerase® (1 U/µl)

Verwendete Oligonukleotide:

Primer I, 5´-3´:	CTT GGT GTA TCG ATT GGT TTT TG
Primer II, 5´-3´:	TTT GCT CCT GCC AGA GGT T

Temperaturzyklus:

2 min 94 °C, (15 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 30 sec 68 °C), 5 min 68 °C, 30 Zyklen.

Elektrophoresebedingungen zur Identifizierung der Restriktionsmuster:

Abweichend von der in Kapitel 2.2.3.4 durchgeführten PAGE-Methode wurde das Gel bei 300 Volt für 6 h entwickelt. Es wurden folgende DNA-Fragmente detektiert:

A (TA) _{6/6} TAA :	71 bp
A (TA) _{6/7} TAA:	71 + 73 bp
A (TA) _{7/7} TAA:	73 bp

2.2.3.12 Berechnung der Genotyp- und Allelfrequenzen

Die Berechnung der Genotyp- und Allelfrequenzen erfolgte mittels des Hardy-Weinberg-Gesetzes (s. u.).

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p: Relative Häufigkeit des Auftretens des Allels A.

q: Allelfrequenz des (zu A komplementären) Allels a

Mit Hilfe dieses Gesetzes lässt sich die Häufigkeit eines Allels in einer Population berechnen, wenn die Häufigkeiten der Genotypen bekannt sind bzw. die Häufigkeit eines Genotyps, wenn die Allelfrequenz bekannt ist.

Die Berechnung der zugehörigen 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) erfolgte anhand folgender Formel:

$$95\% - KI = p\tilde{a} \pm \sqrt{\frac{p\tilde{a}(1-p\tilde{a})}{2n}} * z_{1-\alpha/2}$$

$p\tilde{a}$: Beobachtete Allelfrequenz

n : Anzahl der Genotypen

$z_{1-\alpha/2}$: Krit. Wert der Normalverteilung

Die Berechnung der 95%-Konfidenzintervalle für die Differenz zweier Mittelwerte (95%-KI_{Diff}) erfolgte anhand folgender Formel:

$$95\% - KI_{Diff} = (\bar{y} - \bar{x}) \pm t_{\alpha, \nu} * s * \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}$$

$t_{\alpha, \nu}$: Krit. Wert einer t-verteilten Zufallsgröße mit $\nu = n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden

s^2 : Schätzung der Varianz σ^2

2.2.4 Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakogenetik des Irinotecans

2.2.4.1 Studiendesign

Dieser Arbeit liegt eine offene, multizentrische Phase-IV-Studie zur Bestimmung der Pharmakokinetik und Pharmakogenetik von Irinotecan (CPT-11) und seinen Hauptmetaboliten SN-38 und SN-38-Glucuronid (SN-38-G) zugrunde, in deren Rahmen 20 Patienten teilgenommen haben. Die Studie wurde nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission gemäß den Richtlinien der Good Clinical Practice durchgeführt. Die teilnehmenden Patienten wurden durch die studienbetreuenden Ärzte und Pharmazeuten schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

Die klinisch-pharmazeutischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit drei ortsansässigen onkologischen Zentren durchgeführt:

- Onkologische Tagesklinik der 1. Medizinischen Klinik (Hämatologie/Onkologie), Universitätsklinikum Kiel (Prof. Dr. Frank Gieseler)
- Internistische Kooperative am Dreiecksplatz, Kiel (Dr. Human Bolouri)
- Gemeinschaftspraxis am Sophienhof, Fachärztliches Zentrum für Nephrologie/Dialyse und Hämato-Onkologie, Kiel (Dr. Lothar Plaumann)

Die Patienten, welche an unterschiedlichen Tumorerkrankungen des Darms litten, wurden mit verschiedenen irinotecanhaltigen Chemotherapieprotokollen behandelt.

2.2.4.2 Patientenkollektiv

Die Patienten, die an der Studie teilnahmen, litten vorwiegend an Adenokarzinomen des Kolons bzw. Rektums. Folgende Einschlusskriterien mussten von den Patienten erfüllt werden: Alter zwischen 18 und 85 Jahren, einen *Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status* von 0, 1 oder 2 und eine durch entsprechende Laboruntersuchungen dokumentierte gute Leber- und Nierenfunktion. Da die Auswahl der Patienten sehr begrenzt war und Tumorerkrankungen des Darms oftmals erst im höheren Lebensalter auftreten, wurde die Altersgrenze statt auf die üblichen 75 auf 85 Jahre ausgedehnt, sofern sich die Patienten in einem sonst sehr guten Allgemeinzustand befanden. Zwischen der letzten Chemotherapie und dem

Beginn der Studientherapie lag mindestens eine Woche. Die Charakteristika der Patienten sind in nachfolgender Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.2: Charakteristika der rekrutierten Patienten.

Patient [Abk.]	Geschlecht [F/M]	Alter [Jahre]	Körper- größe [cm]	Körper- gewicht [kg]	KOF* [m²]	Anzahl vorheriger Chemo- therapien	Tumorentität
WJ	M	55	178	77	2.0	1	Rectumkarzinom + Metastasen
HT	M	71	170	98	2.1	1	Adenokarzinom
LM	F	77	165	59	1.7	1	Colonkarzinom + Metastasen
PF	M	73	184	103	2.3	1	Adenokarzinom + Metastasen
UB	M	57	188	80	2.1	2	Coecumkarzinom + Metastasen
RO	M	50	184	97	2.2	1	Rectumkarzinom
GS	M	70	186	90	2.1	1	Coecumkarzinom + Metastasen
HW	M	49	182	80	2.0	1	Rectumkarzinom + Metastasen
MH	F	63	176	70	1.8	3	Sigmakarzinom + Metastasen
GK	F	66	165	56	1.6	3	Coecumkarzinom + Metastasen
KR	M	75	178	75	1.9	1	Rectumkarzinom + Metastasen
US	M	48	179	71	1.9	0	Rectumkarzinom + Metastasen
HTö	F	77	162	73	1.7	2	Rectumkarzinom + Metastasen
HV	M	85	168	72	1.8	1	Rectumkarzinom + Metastasen
RF	M	70	176	91	2.1	1	Sigmakarzinom + Metastasen

Patient [Abk.]	Geschlecht [F/M]	Alter [Jahre]	Körper- größe [cm]	Körper- gewicht [kg]	KOF* [m ²]	Anzahl vorheriger Chemo- therapien	Tumorentität
DJ	M	55	187	101	2.2	1	Adenokarzinom + Metastasen
RB	F	57	157	61	1.6	1	Colonkarzinom
PS	M	60	172	108	2.2	2	Colonkarzinom
AP	M	65	175	87	2.0	1	Rectumkarzinom + Metastasen
GM	F	76	167	62	1.7	1	Sigmakarzinom + Metastasen

*KOF - Körperoberfläche, wurde nach der Formel von DuBois & DuBois (1916) ermittelt.

k.A. - keine Angaben

2.2.4.3 Therapieplan und Studiendesign

Die Patienten wurden mit verschiedenen irinotecanhaltigen Kombinationstherapien behandelt, bei denen Irinotecan in unterschiedlichen Dosierungen und Zyklen appliziert wurde.

Insgesamt wurden 16 Patienten nach dem so genannten FOLFIRI-Therapieprotokoll (Saltz *et al.*, 2001) behandelt. Das Therapieschema für die Kombination von Irinotecan (CPT-11) mit 5-Fluorouracil (5-FU) und Folinsäure ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

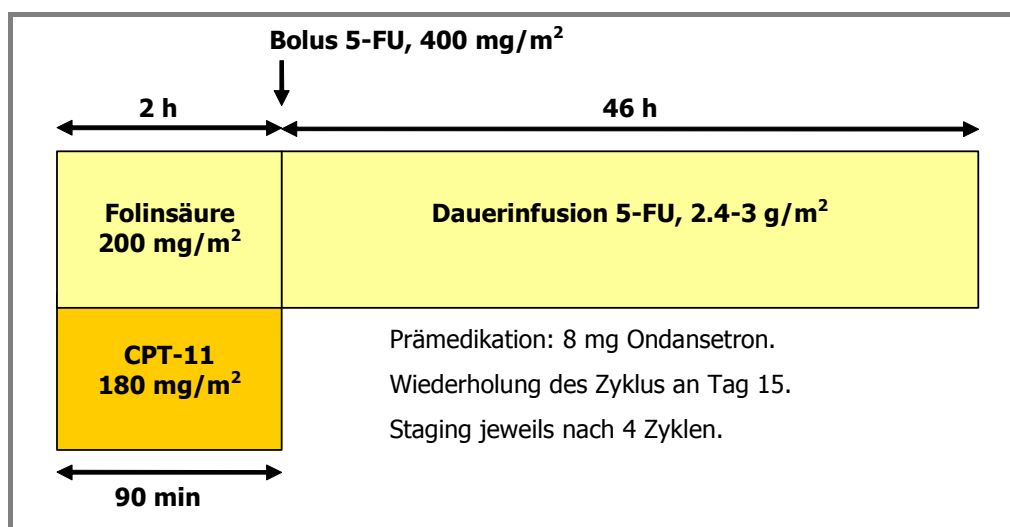


Abb. 2.7: Schematische Darstellung des FOLFIRI-Therapieprotokolls.

Ausgehend von diesem Protokoll erhielten neun der 16 Patienten noch zusätzlich den Angiogenese-Hemmer Bevacizumab (Avastin[®], Roche) in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht.

Vier Patienten erhielten Irinotecan außerhalb des FOLFIRI-Therapieregimes in einer wöchentlichen Gabe, wobei Irinotecan in unterschiedlichen Dosierungen und Kombinationen appliziert wurde. Eine genaue Auflistung der individuell verwendeten Therapieschemata ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Bei allen angewendeten Therapieformen wurde die Applikation von weiteren Kursen bei Auftreten von schwerwiegender Toxizität verschoben bzw. die Dosen von Fluorouracil und/oder Irinotecan für alle nachfolgenden Applikationen um 20% - 25% reduziert.

Tab. 2.3: Verwendete Irinotecan-Therapieschemata.

Therapieprotokoll	Patienten [Abk.]
FOLFIRI, alle 14 Tage	WJ, HT, LM, PF, GS, HTö, HV
FOLFIRI + Bevacizumab (Avastin [®] , Roche) mit 5 mg/kg Körpergewicht, alle 14 Tage	UB, RO, GK, US, RF, RB
FOLFIRI (mit 135 mg/m ² CPT-11) + Bevacizumab (Avastin [®] , Roche) mit 5 mg/kg Körpergewicht, alle 14 Tage	MH
FOLFIRI* (mit 125 mg/m ² CPT-11) + Bevacizumab** (Avastin [®] , Roche) mit 5 mg/kg Körpergewicht, *alle 7 Tage, **alle 14 Tage	GM, KR
Irinotecan mit 125 mg/m ² , alle 7 Tage	HW
Irinotecan* mit 180 mg/m ² + Bevacizumab** (Avastin [®] , Roche) mit 5 mg/kg Körpergewicht, *alle 7 Tage, **alle 14 Tage	DJ
Irinotecan* mit 100 mg/m ² + Capecitabin (Xeloda [®] , Roche) mit 3000 mg tgl. an Tag 1-14, *alle 7 Tage	AP
Irinotecan* mit 50 mg/m ² + Cetuximab* (Erbix [®] , Merck) mit 400 mg/m ² an Tag 1 und mit 200 mg/m ² an Tag 8 und 15, *alle 7 Tage	PS

2.2.4.4 Probenentnahmen

Den Patienten wurden in einem Behandlungszyklus jeweils zehn Blutproben mit einem Volumen von je ca. 5 ml entnommen und aufgearbeitet. Diese Proben dienen zur Untersuchung der Irinotecan-Pharmakokinetik im Plasma und wurden:

- unmittelbar vor Infusionsbeginn,
- direkt nach dem Ende der Irinotecan-Infusion und
- 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 24 und 48 Stunden nach Ende der Irinotecan-Infusion entnommen.

Weiterhin wurde eine Blutprobe von 5 ml zur Aufarbeitung der DNA für die Evaluierung der Pharmakogenetik des Irinotecans vor Infusionsbeginn gewonnen. Abbildung 2.8 veranschaulicht die Applikation von Irinotecan und die Probenentnahmen.

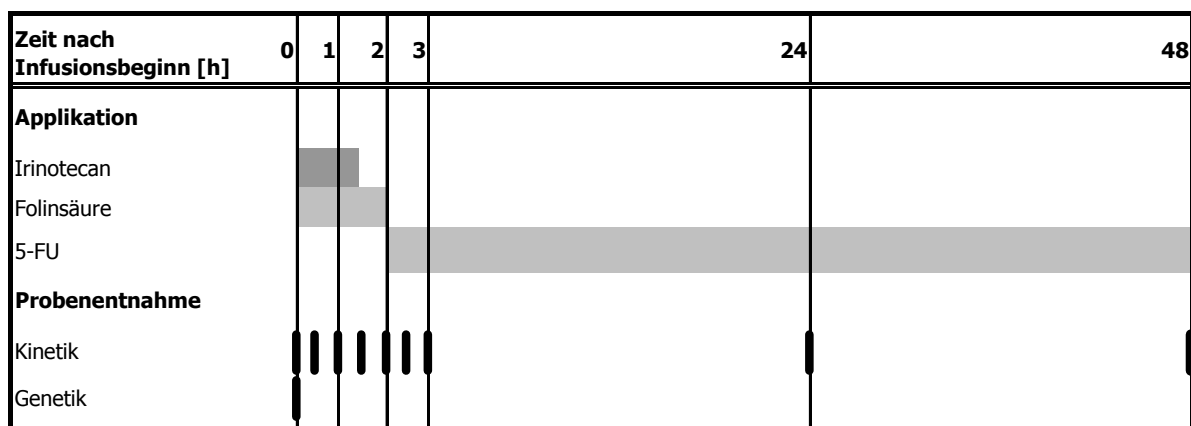


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Irinotecan-Applikation und der Probenentnahmen.

2.2.4.5 Probengewinnung, -aufarbeitung und -lagerung

Die Blutabnahmen wurden in allen onkologischen Zentren aus einem peripheren Zugang (meistens der *Vena mediana cubiti*) vorgenommen, um eine Kontamination der Proben mit Irinotecan direkt aus der Infusion zu vermeiden. Zusätzlich wurde vor der eigentlichen Probenentnahme jeweils 1 ml Blut aufgezogen und verworfen. Zur Abnahme wurden Monovetten® mit EDTA als Antikoagulanzen verwendet. Alle

Blutproben wurden sofort nach der Abnahme auf Eis gelagert und innerhalb von vier Stunden aufgearbeitet um Umverteilungsvorgänge zwischen verschiedenen Blutbestandteilen zu unterbinden. Die zur Aufarbeitung erforderlichen Zentrifugationsschritte wurden aus demselben Grund bei 4 °C durchgeführt.

Das zur Bestimmung der Pharmakokinetik benötigte Plasma wurde durch Zentrifugation der Monovette[®] (10 min, 1500 g, 4 °C) erhalten. Es wurden 3 x 1 ml des gewonnenen Plasmas in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

Zur DNA-Extraktion für die Pharmakogenetik wurden pro Patient 3 ml venöses Blut benötigt. Die zu untersuchende DNA konnte dann mit dem Gentra Puregene Blood kit[®] aus dem Gesamtblut gewonnen werden (Kap. 2.2.3.1).

2.2.5 Klinische Dokumentation

2.2.5.1 Demographische Daten

Um den Einfluss individueller Faktoren auf die untersuchten pharmakokinetischen Parameter charakterisieren zu können, wurden bei allen Patienten das Alter bei Aufnahme in die Studie, die Körpergröße, das Körpergewicht, die Körperoberfläche und das Geschlecht dokumentiert. Außerdem wurden die vorliegende Tumorerkrankung sowie die Patientenhistorie v.a. in Hinblick auf das Ausmaß der Vorbehandlung, charakterisiert durch die Anzahl im Vorfeld verabreichter Chemotherapieprotokolle, aufgenommen.

2.2.5.2 Laborparameter

Im Verlauf der Therapie wurde bei den Patienten eine Reihe von Laborwerten routinemäßig überwacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Parameter dokumentiert:

- Hämoglobin [g/dl], Leukozytenzahl [$\times 10^9/l$] und Thrombozytenzahl [$\times 10^9/l$]
- Serumkreatininkonzentration [mg/dl]
- GOT [U/l], GPT [U/l] und AP [U/l].

2.2.5.3 Therapieassoziierte Toxizität

Die therapieassoziierte Toxizität wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand der Toxizitätskriterien des National Cancer Institute beurteilt (Common-Toxicity-Criteria, 1999; s. Kap. 5.1). Die unerwünschten Wirkungen der Therapie wurden dabei in 5 Schweregrade unterteilt: 0 = keine, 1 = mild, 2 = mäßig, 3 = ausgeprägt, 4 = lebensbedrohlich.

Hämato-, nephro- und hepatotoxische Effekte wurden mit Hilfe der dokumentierten Laborparameter erfasst und beurteilt.

Neben diesen bei fast allen antineoplastischen Therapien auftretenden unerwünschten Wirkungen zeigen sich bei irinotecanhaltigen Chemotherapien oftmals sehr schwere Diarrhöen, die häufig dosislimitierend sind (Kapitel 2.1.2.1). Art, Schwere und Dauer der Beschwerden wurden in den verschiedenen onkologischen Zentren durch eine Patientenbefragung erfasst und dokumentiert. Zur Bewertung der irinotecaninduzierten Diarrhöen wurden ebenfalls die Toxizitätskriterien des National Cancer Institute herangezogen:

Grad 0:	Keinerlei Beschwerden
Grad 1:	$\geq 2 - 3$ Stühle/Tag mehr als vorher
Grad 2:	$\geq 4 - 6$ Stühle/Tag, nächtlicher Stuhlgang, mäßige Tenesmen
Grad 3:	$\geq 7 - 9$ Stühle/Tag, Inkontinenz, starke Tenesmen
Grad 4:	≥ 10 Stühle/Tag, blutige Diarrhö, parenterale Infusionen erforderlich

2.2.6 Pharmakokinetische Datenanalyse

In vorliegender Arbeit wurden aus den erhaltenen Konzentrations-Zeit-Verläufen im Plasma für jeden Patienten die individuellen pharmakokinetischen Parameter für Irinotecan, SN-38 und SN-38-Glucuronid berechnet.

Die folgenden Parameter wurden in die Untersuchung aufgenommen:

$t_{1/2}$ (Halbwertszeit), C_{\max} (maximale gemessene Konzentration), $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt der Applikation bis zum Zeitpunkt der letzten gemessenen Konzentration), $AUC_{0-\infty}$ (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt der Applikation bis Unendlich), $AUC_{\text{Dosis } 0-\infty}$ (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve bezogen auf die verabreichte Irinotecan-Dosis), $AUC_{\text{extrapol.}}$ (extrapolierter Anteil der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve der

terminalen Phase), $Cl_{0-t_{last}}$ (Clearance vom Zeitpunkt der Applikation bis zum Zeitpunkt der letzten gemessenen Konzentration), $MRT_{0-t_{last}}$ (mittlere Verweildauer vom Zeitpunkt der Applikation bis zum Zeitpunkt der letzten gemessenen Konzentration) und $Vz_{0-t_{last}}$ (Verteilungsvolumen vom Zeitpunkt der Applikation bis zum Zeitpunkt der letzten gemessenen Konzentration).

Bei neun Patienten fehlte entweder der 24-h- oder der 48-h-Wert der Probennahme. Damit die AUCs der Patienten ohne Verzerrungen der Ergebnisse miteinander verglichen werden konnten, mussten die fehlenden Daten durch Schätzwerte ersetzt werden. Gerade bei kleinen Fallzahlen, wie es bei der vorliegenden Studie der Fall ist, handelt es sich um eine legitime Methode, eine drastische Datenreduzierung durch Ausschluss der entsprechenden Versuchseinheiten zu vermeiden (Rehak, 1998).

Für die Abschätzung der pharmakokinetischen Parameter wurde eine modellunabhängige Datenanalyse durchgeführt.

Alle Berechnungen wurden mit Hilfe der validierten Software WinNonlin[®], Version 4.0 (Pharsight Corporation, Kalifornien) ausgeführt.

2.2.6.1 Modellunabhängige Datenanalyse

Aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen wurden zunächst die maximalen Konzentrationen (C_{max}) und die Zeitspanne, bis diese auftraten (t_{max}), abgelesen. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ($AUC_{0-t_{last}}$) vom Infusionsbeginn bis zu 48 Stunden nach Infusionsbeginn wurde mit Hilfe der linearen Trapezregel bestimmt. Die Fläche unter der Kurve wurde dazu in einzelne Trapeze eingeteilt, deren Flächen berechnet und diese schließlich addiert. Die AUC vom ersten (C_0, t_0) bis zum letzten Messwert (C_z, t_z) wurde über die einzelnen Trapezflächen nach folgender Formel ermittelt:

$$AUC_{0-t_z} = \sum_{i=1}^z \frac{(C_{i-1} + C_i)}{2} * (t_i - t_{i-1})$$

Der extrapolierte Anteil der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve der terminalen Phase ($AUC_{t_z-\infty}$) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$AUC_{t_z-\infty} = \frac{C_z}{k_e}$$

Die Gesamtfläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve bis unendlich ($AUC_{0-\infty}$) berechnete sich folgendermaßen:

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t_z} + AUC_{t_z-\infty}$$

Um die AUC_{Dosis} zu erhalten, wurde die $AUC_{0-\infty}$ durch die applizierte Irinotecan-Dosis geteilt.

Die terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k_e wurde über die Steigung der aus der halblogarithmischen Darstellung der Plasmakonzentrationen der terminalen Phase gegen die Zeit ermittelten Gerade bestimmt. Die Steigung der Regressionsgeraden in diesem Bereich entspricht $-k_e$. Aus k_e wurde $t_{1/2}$ nach unten dargestellter Gleichung abgeleitet.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

Als Maß für die Eliminationsleistung des Körpers wurde die Clearance (CL) herangezogen. Sie beschreibt das Volumen, das in einer bestimmten Zeiteinheit vom Arzneistoff befreit wird. Die Gesamtkörperclearance, setzt sich additiv aus den Clearances der einzelnen Eliminationsorgane zusammen. Für die Berechnung der Clearance wurde folgende Gleichung verwendet:

$$CL = \frac{Dosis}{AUC_{\infty}}$$

Die Verweildauer eines Arzneistoffs im Organismus und der zeitliche Verlauf seiner Konzentration können statistisch als eine Häufigkeitsverteilung angesehen werden. Wird eine Dosis eines Arzneimittels appliziert, dann werden einige der resorbierten Arzneistoffmoleküle rasch aus dem Körper ausgeschieden, während andere länger im Körper verbleiben. Die mittlere Verweildauer (MRT) entspricht der durchschnittlichen Aufenthaltsdauer der applizierten Arzneistoffmoleküle und kann berechnet werden nach:

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

Die AUMC wird als Gesamtfläche unter der ersten Moment-Kurve bezeichnet und

entspricht der Fläche unter der Kurve für eine graphische Darstellung des Produktes aus Plasmaspiegel und Zeit gegen die Zeit.

Unter dem Verteilungsvolumen (V_z) versteht man einen Proportionalitätsfaktor, der die gemessene Arzneistoffkonzentration mit der Gesamtarzneistoffmenge im Organismus in Beziehung setzt und daher die Einheit eines Volumens hat. Das Verteilungsvolumen wurde wie folgt berechnet:

$$V_z = \frac{\text{Dosis}}{k_e * AUC_\infty}$$

2.2.7 Statistik

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Microsoft® Excel 2002 und STATISTICA für Windows, Version 6 (StatSoft, Inc. (2001)).

2.2.7.1 Deskriptive Statistik

Zur zusammenfassenden Darstellung der Daten wurden folgende Lokalisations- und Dispersionsmaße herangezogen:

Median (\tilde{X}):

Der Median ist derjenige Wert einer Verteilung unter- und oberhalb dessen 50% der Messwerte liegen.

Arithmetischer Mittelwert (\bar{X}):

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n xi}{n}$$

X_i : Messwert

n : Anzahl der Messungen

Standardabweichung (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Relative Standardabweichung (RSD):

$$RSD [\%] = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} * 100$$

2.2.7.2 Beschreibende Statistik

Mit Hilfe der Teststatistik wird beurteilt, welche von zwei gegensätzlichen Hypothesen (Nullhypothese oder Alternativhypothese) über die Grundgesamtheit von Messwerten angenommen werden kann. Je nach Fragestellung und Beschaffenheit der Messwerte wurde ein entsprechender statistischer Test ausgewählt und die jeweilige Irrtumswahrscheinlichkeit (p) berechnet, mit der die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird. Das Ergebnis wurde als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag ($p < 0.05$). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tests werden im Folgenden kurz erläutert.

Prüfung auf Normalverteilung

Zunächst wurden die zu untersuchenden Variablen auf Normalverteilung geprüft. Dazu wurde der *Shapiro-Wilk*-Test angewandt.

Gruppenvergleich

Zur Beurteilung, ob sich Gruppen hinsichtlich bestimmter Merkmale signifikant unterscheiden, wurden verschiedene statistische Tests herangezogen. Der jeweilige Test wurde in Abhängigkeit von der Skalierung und Verteilung der zu untersuchenden Parameter ausgewählt. Dabei wurde weiterhin unterschieden, ob es sich um abhängige oder unabhängige Variablen handelte, und wie viele Gruppen miteinander verglichen werden sollten.

Für zwei unabhängige normalverteilte Stichproben wurde der *t-Test nach Student* durchgeführt und für mehr als zwei unabhängige Variablen wurde eine einfache *Varianzanalyse* (ANOVA) durchgeführt. Bei nicht-normalverteilten Variablen wurden in Abhängigkeit vom Stichprobenumfang unterschiedliche nicht-parametrische Tests durchgeführt. Bei diesen wurden nicht die Messwerte selbst, sondern deren Rangplätze für die Berechnung herangezogen. Für zwei unabhängige Stichproben wurde der *U-Test nach Mann und Whitney* durchgeführt und für mehr als zwei unabhängige Stichproben der *H-Test nach Kruskal und Wallis*.

Korrelationsanalyse

Bei einer Korrelationsanalyse wird die Existenz, Stärke und Richtung eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen untersucht. Die Berechnung gründet sich auf Wertepaare, die aus den zugrunde liegenden abhängigen Stichproben gebildet werden. Die Stärke des Zusammenhangs wird mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten (r) charakterisiert, der Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann. Liegt ein starker Zusammenhang vor, so ist $r = 1$; existiert gar kein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen, so ist $r = 0$. Negative Korrelationskoeffizienten deuten auf einen gegenläufigen Zusammenhang hin.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten hängt vom Skalenniveau und der Verteilung der zu untersuchenden Variablen ab. Bei intervallskalierten und normalverteilten Variablen wurde die Korrelation nach *Pearson*, bei mindestens einer ordinalskalierten oder nicht-normalverteilten Variable wurde die Rangkorrelation nach *Spearman* berechnet.

Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse quantifiziert den Zusammenhang zwischen einer unabhängigen und einer abhängigen Variablen. Sie dient dazu, Zusammenhänge zu erkennen und die Art des Zusammenhangs zu erklären sowie den Wert der abhängigen aus den Werten der unabhängigen Variablen vorherzusagen. Mit Hilfe einer einfachen linearen Regressionsanalyse wird eine Gleichung ermittelt, die den linearen Zusammenhang der unabhängigen Variablen x und dem abhängigen Parameter y beschreibt.

$$y = a * x + b$$

a : Steigung der Regressionsgleichung

b : Ordinatenabschnitt der Regressionsgleichung

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Quantifizierung von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G im Plasma

Um pharmakokinetische Parameter von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G im Plasma ermitteln zu können, wurde ein bioanalytisches Verfahren benötigt, welches eine Quantifizierung ermöglichte.

Zur Quantifizierung der drei Analyten wurde somit eine HPLC-Methode etabliert, mit der die Bestimmung dieser drei Analyten nebeneinander möglich war. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die von Poujol *et al.* (2003) beschriebene Methode modifiziert, an die Aufgabenstellung dieser Arbeit angepasst und gemäß internationaler Richtlinien validiert.

Zur quantitativen Bestimmung des Irinotecans und SN-38 wurde eine matrixadaptierte Kalibrierung mit den unter Kapitel 2.2.2.3 hergestellten Kalibratorlösungen durchgeführt. Abbildung 2.9 zeigt die jeweils durch lineare Regression erhaltene Ausgleichsgerade der Kalibrierung von CPT-11 und SN-38. Alle Funktionen der 7-Punkt-Kalibrierungen waren in dem untersuchten Konzentrationsbereich linear. Zur quantitativen Bestimmung niedrigerer CPT-11-Konzentrationen (< 100 ng/ml) wurde die Gleichung der resultierenden Regressionsgeraden der Kalibrierung von CPT-11 in dem Bereich von 2.5 - 100 ng/ml verwendet. Der Korrelationskoeffizient für diese Regressionsgerade betrug 0.999.

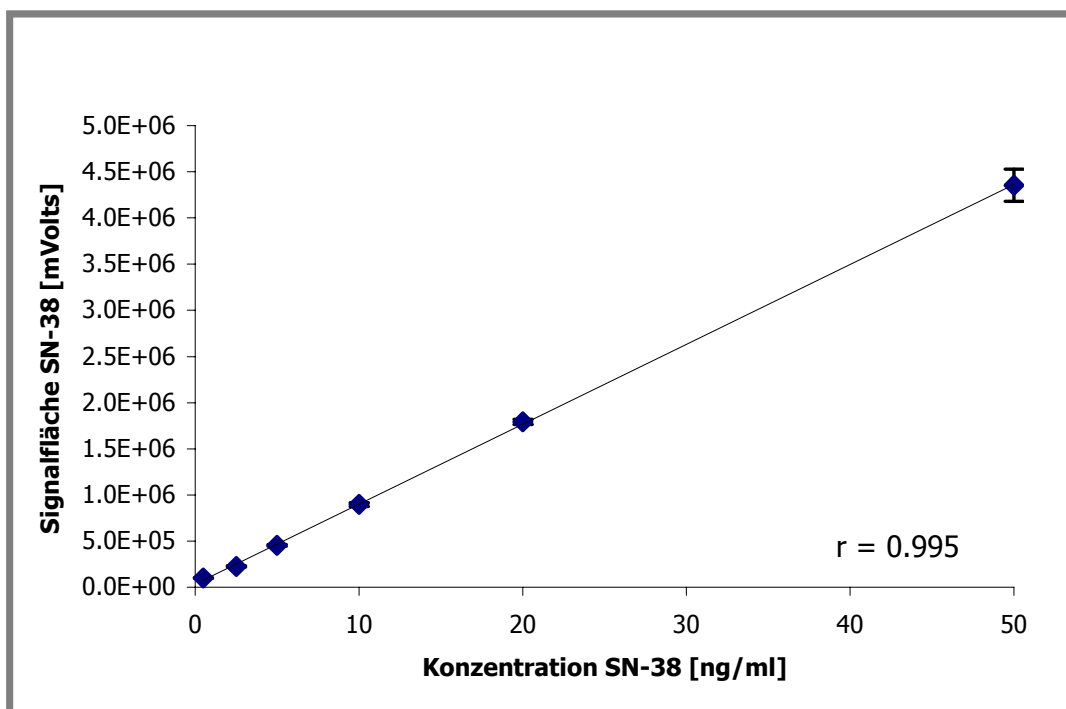
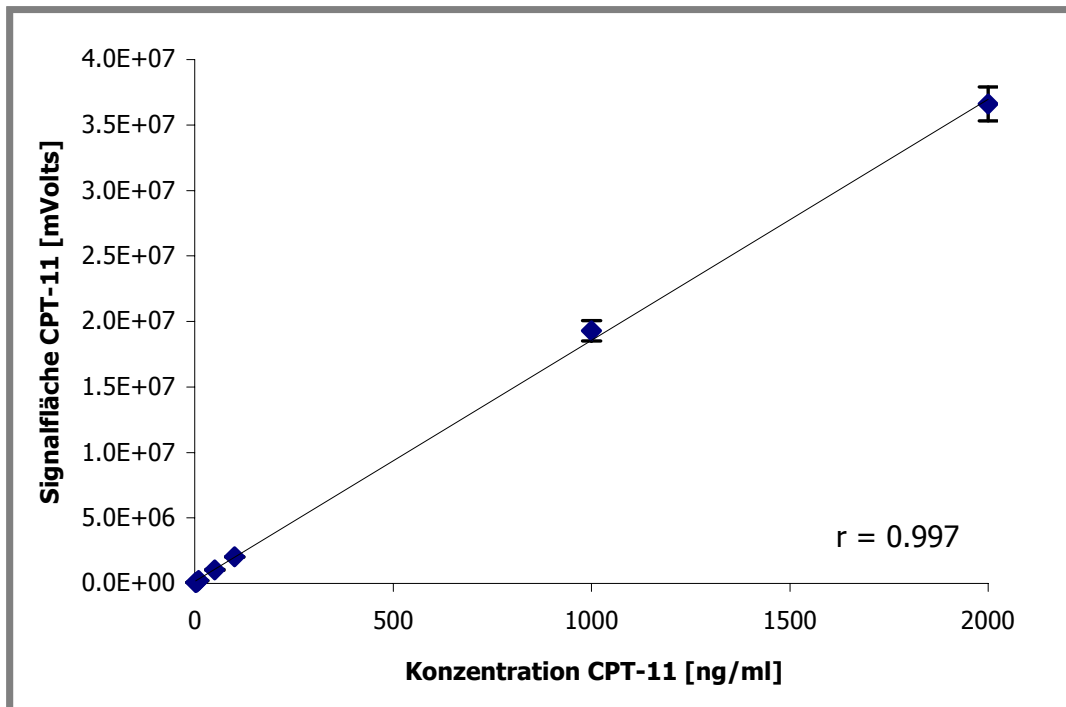


Abb. 2.9: Kalibrierung von CPT-11 und SN-38. Die Signalflächen sind die Mittelwerte \pm SD aus $n = 6$, jeweils doppelt vermessen.

Zur Quantifizierung des glucuronidierten Metaboliten SN-38-G musste eine indirekte Methode (Chester *et al.*, 2003; de Bruijn *et al.*, 1997) mangels fehlenden Standards gewählt werden. Dazu wurden sämtliche Patientenproben für jeden

Abnahmezeitpunkt einmal mit und einmal ohne Zugabe von β -Glucuronidase aufgearbeitet und analysiert. Durch die Zugabe des Enzyms wurde das vorhandene SN-38-G gespalten und es konnte eine Zunahme der SN-38-Signalfäche beobachtet werden. Durch Vergleich der erhaltenen Signalfächen mit Zusatz und ohne Zusatz der β -Glucuronidase konnte dann die entsprechende Konzentration des SN-38-Glucuronids zu dem jeweiligen Abnahmezeitpunkt bestimmt werden.

In Abbildung 2.10 sind zwei HPLC-Chromatogramme dieser unterschiedlichen Probenaufarbeitungen beispielhaft dargestellt.

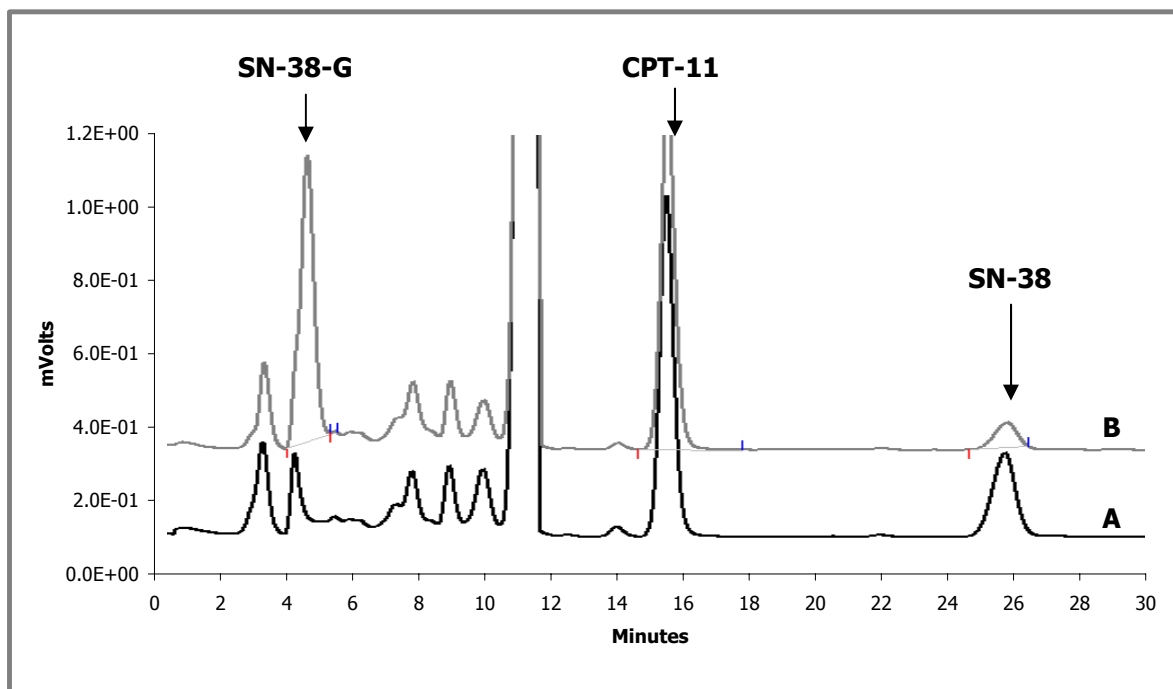


Abb. 2.10: Repräsentative HPLC-Chromatogramme von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G, erhalten durch Aufarbeitung einer Patientenprobe [A] mit β -Glucuronidase und [B] ohne β -Glucuronidase.

In Chromatogramm A kann bei der Retentionszeit von SN-38-G noch ein kleiner Peak detektiert werden, bei dem es sich aber nicht um den zu bestimmenden Analyten handelt. Wie durch Leerplasma verifiziert wurde, handelte es sich dabei um einen Störpeak, der durch die Matrix verursacht wurde. Eine Modifikation des chromatographischen Systems zur Eliminierung dieses Störpeaks war jedoch nicht notwendig, da die Signalfäche des Peaks nicht für die Quantifizierung des glucuronidierten Metaboliten verwendet wurde.

2.3.2 Validierung

Die Validierung erfolgte auf der Grundlage internationaler Anforderungen an bioanalytische Verfahren (FDA, 2001; Kromidas, 2000).

Unter Validierung versteht man den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer analytischen Methode zur Erzeugung reproduzierbarer Daten. Als ein Instrument der Qualitätssicherung ist sie Voraussetzung für die quantitative Bestimmung unterschiedlicher Substanzen. Sie umfasst alle Teilschritte der Bestimmungsmethode, d.h. sie zeigt, dass die Methode der Probenaufarbeitung und Messung für den beabsichtigten Zweck, der Erzeugung ergebnissicherer pharmakokinetischer Daten für den Wirkstoff Irinotecan und seinen Metaboliten SN-38 und SN-38-Glucuronid, geeignet ist.

In dieser Studie sind folgende Elemente in die Validierung einbezogen worden:

- Selektivität
- Messbereich und Bestimmungsgrenze
- Linearität
- Wiederfindung
- Richtigkeit und Präzision

2.3.2.1 Selektivität

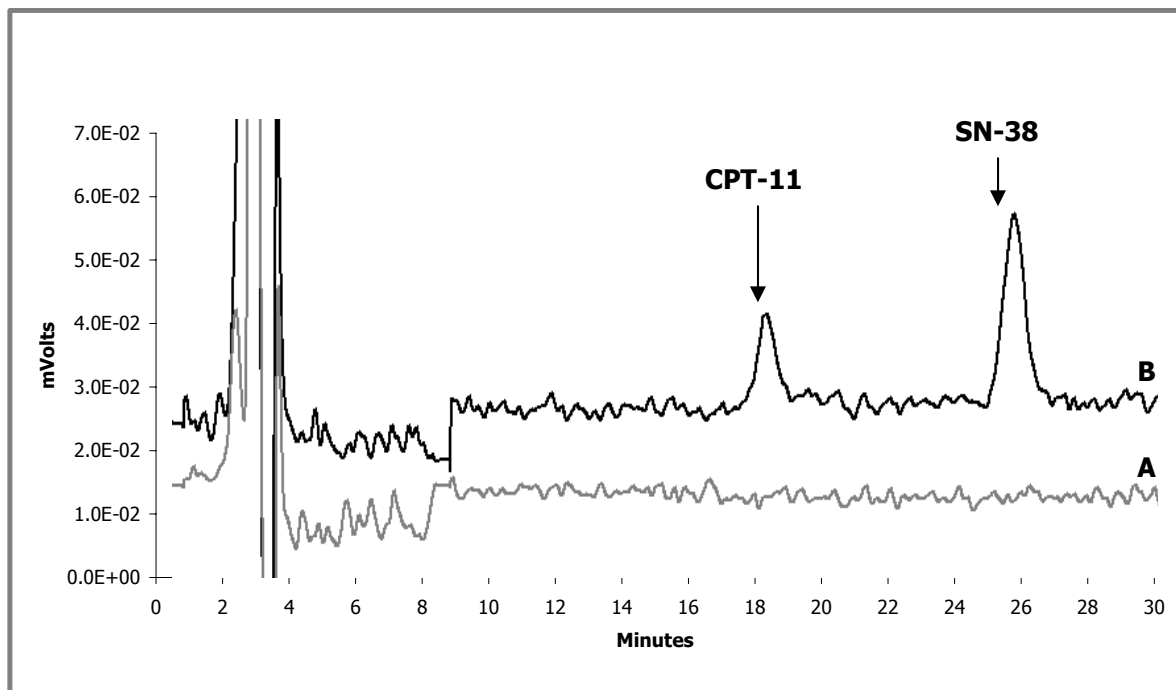


Abb. 2.11: Repräsentative HPLC-Chromatogramme von Irinotecan und SN-38 [A] Leermatrix und [B] Kalibrator 1 (CPT-11: 2.5 ng/ml und SN-38: 0.5 ng/ml).

Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren. Die Identifizierung darf nicht durch andere in der Probe vorhandene Komponenten (z.B. Komedikationen, Matrixeffekte, usw.) gestört werden.

Die Selektivität der hier angewandten Methode wurde durch Vergleich von Chromatogrammen der aufgearbeiteten Leermatrix (Abb. 2.11 A) mit Chromatogrammen ermittelt, die vom Kalibrator mit der niedrigsten Irinotecan- und SN-38-Konzentration (Abb. 2.11 B) erhalten wurden. Die Leermatrix wurde dabei von mindestens sechs verschiedenen Spendern gewonnen, gemischt und untersucht.

Durch das Fehlen von Störpeaks zu den Retentionszeiten der interessierenden Analyten in der untersuchten Leermatrix konnte eine gute Selektivität gezeigt werden. Die Signale des Kalibrators waren im Mittel siebenmal so hoch, wie die der Leermatrix. Des Weiteren lag für beide Analyten eine gute Auflösung vor.

2.3.2.2 Messbereich und Bestimmungsgrenze

Der Arbeitsbereich ist der Konzentrationsbereich des Analyten in der Probe (untere/obere Grenze) mit einem akzeptablen Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität. Der Arbeitsbereich kann aus der Linearität abgeleitet werden.

Für die pharmakokinetischen Untersuchungen war es notwendig, Irinotecan in einem Bereich von insgesamt 2.5 bis 2000 ng/ml zu quantifizieren. Da innerhalb derartiger Konzentrationsunterschiede oftmals keine proportionalen Beziehungen zwischen Detektorsignal und Konzentration zu erwarten sind bzw. die niedrigen Konzentrationen nur noch mangelhafte Ergebnisse liefern, wurde der Messbereich in zwei Konzentrationsbereiche unterteilt. Für die niedrigeren Konzentrationen (<100 ng/ml) wurde der Messbereich von 2.5 - 100 ng/ml gewählt und für die höheren Konzentrationen (>100 ng/ml) der gesamte Bereich von 2.5 - 2000 ng/ml. Für SN-38 wurde der Messbereich auf Konzentrationen zwischen 0.5 - 50 ng/ml festgelegt.

Die unterste Bestimmungsgrenze ist definiert als diejenige Irinotecan- bzw. SN-38-Konzentration, für die folgende Bedingungen erfüllt sind:

- Das Signal für die entsprechende Konzentration sollte etwa fünfmal so hoch sein wie das der analytenfreien Matrix.

- Die Konzentration soll mit einem relativen Fehler von höchstens 20% und einer relativen Standardabweichung (s. Kap. 2.3.2.5) von höchstens 20% bestimmt werden können.

Zunächst wurden die Signalflächen der analytenfreien Matrix und die Signalflächen des untersten Kalibrators aus sechs verschiedenen Kalibrierungen miteinander verglichen und die Verhältnisse berechnet.

Für CPT-11 lagen die berechneten Verhältnisse bei 6 - 7 und für SN-38 bei 8 - 10, womit die erste Bedingung zur Festlegung der Bestimmungsgrenze erfüllt werden konnte.

Weiterhin wurde bei sechs Kalibrierreihen, die an unterschiedlichen Tagen aufgenommen wurden, die Richtigkeit und Präzision der Bestimmung einer von der Kalibrierung unabhängigen Probe kontrolliert, die dieselbe Konzentration aufwies, wie der am niedrigsten konzentrierte Standard und die damit postulierte Bestimmungsgrenze.

Wie Tabelle 2.4 zu entnehmen ist, konnten diese Proben für CPT-11 und SN-38 in dem jeweiligen Konzentrationsbereich mit der erforderlichen Richtigkeit und Präzision quantifiziert werden.

Somit wurden als Bestimmungsgrenze für CPT-11 2.5 ng/ml und für SN-38 0.5 ng/ml ermittelt.

Tab. 2.4: Überprüfung der Bestimmungsgrenze anhand von Richtigkeit (RE [%]) und Präzision (RSD [%]) (n = 6).

Analyt	Konzentration [ng/ml]	RE [%]	RSD [%]
CPT-11	2.5	-4.8	6.2
SN-38	0.5	-14.2	3.2

2.3.2.3 Linearität

Die Linearität der erhaltenen Kalibrierfunktionen wurde anhand folgender Kriterien überprüft:

- Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgerade sollte ≥ 0.99 sein.
- Die erhaltenen Signalflächen wurden in die korrespondierenden

Konzentrationen umgerechnet. Dabei sollten die Konzentrationen nicht mehr als 15% von ihren Nominalwerten abweichen. Im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden bis zu 20% Abweichung akzeptiert. Vier von insgesamt sechs Kalibratoren sollten diese Kriterien erfüllen; dazu sollten in jedem Fall die Kalibratoren mit der niedrigsten und der höchsten Konzentration gehören.

Für sechs Kalibriergeraden, die an sechs Tagen aufgenommen wurden, waren diese Kriterien erfüllt.

Die relativen Abweichungen der gemessenen Konzentration vom Nominalwert (s. Kap. 2.2.2.3 und Tab. 2.1) und die relativen Standardabweichungen lagen für alle Kalibratoren unterhalb der geforderten 15%. Im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden Werte deutlich unter 20% erhalten (Tab. 2.5).

Tab. 2.5: Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) der Kalibratoren (n = 6).

Analyt	Parameter	Standards						
		1	2	3	4	5	6	7
CPT-11	RE [%]	3.5	1.6	-0.1	-5.7	0.5	-4.2	-9.0
	RSD [%]	8.1	5.6	3.6	7.3	5.9	4	3.5
SN-38	RE [%]	6.2	-0.1	0.9	-1.5	-1.8	3.3	2.5
	RSD [%]	5.5	2.8	4.8	3.0	2.6	1.5	5.4

2.3.2.4 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate bezeichnet den Irinotecan- bzw. SN-38-Anteil, der nach Aufarbeitung einer Probe im Vergleich zu einer wässrigen, nicht aufgearbeiteten Probe gleicher Konzentration quantifiziert wird.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate (WFR) wurden vier Plasmaproben unterschiedlicher Konzentrationen, die den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (Tab. 2.1) abdeckten, hergestellt und aufgearbeitet (Kap. 2.2.2.1). Außerdem wurden Lösungen in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.4 hergestellt, deren Konzentrationen den Sollkonzentrationen nach der Aufarbeitung entsprachen. Alle Lösungen wurden jeweils sechsmal vermessen. Die Signalflächen

der Plasmaproben wurden mit denen der wässrigen Proben gleicher Konzentration verglichen, die ohne weitere Vorbereitung gemessen wurden. Das Verhältnis der erhaltenen Signalflächen für die matrixhaltigen Proben ($A_{\text{Matrix, aufgearbeitet}}$) und die wässrigen Proben (A_{Wasser}) ergab die WFR 1, die in Tabelle 2.6 als mittlere Wiederfindungsrate dargestellt ist.

WFR 1 wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$WFR\ 1\ [\%] = \frac{A_{\text{Matrix, aufgearbeitet}}}{A_{\text{Wasser}}} * 100$$

Durch diese Untersuchung wurde der Einfluss der Matrix und ihrer Aufarbeitung auf die Höhe der Signalflächen charakterisiert. Die erhaltenen Werte zeigen, dass die Matrixbestandteile einen Einfluss auf die Höhe der Signalflächen hatten. Die Streuung der Werte entsprach in etwa der Interday-Präzision bei der Bestimmung der Linearität (s. Tab. 2.5).

Tab. 2.6: Mittlere Wiederfindungsrate (WFR [%]; MW \pm SD; jeweils n = 6).

Analyt	Konzentration [ng/ml]	WFR 1	WFR 2	WFR 3
CPT-11	2.5	100.6 \pm 8.6	102.7 \pm 4.8	94.0 \pm 12.0
	50	110.7 \pm 4.8	115.5 \pm 3.4	96.8 \pm 4.0
	1000	105.7 \pm 2.8	102.1 \pm 6.5	98.4 \pm 4.0
	2000	110.6 \pm 5.7	103.5 \pm 2.1	91.6 \pm 0.9
SN-38	0.5	105.4 \pm 3.5	106.4 \pm 5.7	93.8 \pm 4.7
	2.5	101.7 \pm 6.4	102.1 \pm 4.1	93.8 \pm 2.9
	10	104.3 \pm 2.9	110.4 \pm 5.1	95.6 \pm 1.4
	20	110.0 \pm 6.4	104.5 \pm 1.1	94.4 \pm 1.6

Die Plasmaproben, die einen hohen Anteil an Matrixbestandteilen aufweisen, zeigten gegenüber einer wässrigen Probe gleicher Konzentration eine höhere Signalfläche und damit eine WFR 1 über 100%. Da deutliche Matrixeffekte vorlagen, war es notwendig, eine matrixadaptierte Kalibrierung durchzuführen, um für die Kalibratoren

wie auch für die zu vermessenden Proben einen ähnlichen Anteil an Matrixbestandteilen und somit ein ähnliches Element-Matrix-Verhältnis zu erhalten.

Um die Einflüsse von Matrix und Aufarbeitung getrennt zu untersuchen, wurden neben den oben genannten Lösungen auch noch Lösungen in Wasser hergestellt, die hinsichtlich ihrer Konzentrationen den matrixhaltigen Proben entsprachen und die ebenso wie diese gemäß dem Probenaufarbeitungsprotokoll zur Messung vorbereitet wurden. Deren Signalfächen ($A_{\text{Wasser, aufgearbeitet}}$) wurden sowohl mit denen der rein wässrigen Proben als auch mit denen der matrixhaltigen Proben verglichen (WFR 2 und 3).

WFR 2 und WFR 3 wurden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$WFR\ 2\ [\%] = \frac{A_{\text{Matrix, aufgearbeitet}}}{A_{\text{Wasser, aufgearbeitet}}} * 100$$

$$WFR\ 3\ [\%] = \frac{A_{\text{Wasser, aufgearbeitet}}}{A_{\text{Wasser}}} * 100$$

Die WFR 2 lag auch deutlich über 100% und bestätigte das Ergebnis, dass die Matrixbestandteile die Signale erhöhten. Die Aufarbeitung hingegen hatte eher einen gegenteiligen Effekt. Die WFR 3, die diesen Einfluss quantifizierte, war für alle Proben geringer als die WFR 2; dies deutete darauf hin, dass durch die Aufarbeitung die Signale eher verringert wurden.

2.3.2.5 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit einer analytischen Methode beschreibt die Übereinstimmung einer gemessenen Konzentration (C_{gem}) mit der nominalen Konzentration (C_{nom}) und die Präzision die Übereinstimmung der Messwerte bei wiederholter Bestimmung. Die Richtigkeit der Methode wurde anhand der relativen Fehler und die Präzision anhand der relativen Standardabweichungen (*Relative Standard Deviation*, RSD; s. Kap. 2.2.7.1) charakterisiert.

Nach Analyse von vier festgelegten Konzentrationen, die sowohl sechsmal an einem Tag (*Intraday*) bzw. an sechs unterschiedlichen Tagen (*Interday*) durchgeführt wurde, wurde der Mittelwert (MW C_{gem}) berechnet und dessen Abweichung von der

Nominalkonzentration als relativer Fehler (*Relative Error*, RE) ausgedrückt:

$$RE [\%] = \frac{(MW C_{gem} - C_{nom})}{C_{nom}} * 100$$

Der relative Fehler des Mittelwerts und die relative Standardabweichung sollten 15% nicht überschreiten; im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden bis zu 20% toleriert.

In der nachfolgenden Tabelle 2.7 werden die Ergebnisse zusammengefasst. Die mittleren Konzentrationen zeigten geringere relative Fehler als $\pm 15\%$. Eine Ausnahme war die CPT-11-Probe mit einer Konzentration von 2.5 ng/ml, dort wurde ein relativer Fehler des Mittelwerts von 16% festgestellt. Dies war aber im Bereich der Bestimmungsgrenze, in dem Fehler von bis zu 20% zulässig sind, akzeptabel. Für die Präzision ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Die relativen Standardabweichungen unterschritten deutlich 15%. Auch im Bereich der Bestimmungsgrenzen wurden keine Standardabweichungen $>15\%$ erhalten.

Tab. 2.7: Intraday- und Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) für Irinotecan und SN-38 (jede Konzentration n = 6).

		Konzentrationen [ng/ml]				
		CPT-11 SN-38	2.5 0.5	50 2.5	1000 10	2000 20
Intraday	CPT-11	RE [%]	-7.5	-3.9	-0.5	1.5
		RSD [%]	2.8	2.2	1.9	0.9
	SN-38	RE [%]	-12.4	-6.4	2.1	5.1
		RSD [%]	3.5	1.8	1.1	1.4
Interday	CPT-11	RE [%]	-16.0	4.3	1.5	-2.3
		RSD [%]	6.2	0.8	1.0	2.4
	SN-38	RE [%]	-13.5	-3.4	2.1	-0.1
		RSD [%]	3.2	2.6	1.4	2.6

2.3.3 Genotypisierung

Die vervielfältigte und verdaute DNA der Patienten wurde zur Identifizierung der interessierenden Polymorphismen durch eine Polyacrylamidgel- bzw. Agarosegelelektrophorese untersucht. Die entstandenen DNA-Fragmente wandern dabei abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die netzähnlichen Strukturen des Gels und werden anschließend mittels Ethidiumbromid detektiert. Die entstandenen Restriktionsmuster für die unterschiedlichen Genotypen können daraufhin abgelesen und dokumentiert werden.

2.3.3.1 Analyse von Reinheit und Ausbeute der isolierten DNA

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte spektralphotometrisch (Schrimpf, 2002). Die Absorption der extrahierten DNA wurde dabei gegen einen Leerwert bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen (s. Kap. 2.2.3.2). Die Konzentration der DNA konnte anschließend aus der Absorption bei 260 nm berechnet werden.

Im Durchschnitt wurden bei der Isolierung 600 µg DNA aus 3 ml Vollblut gewonnen.

Um die Reinheit der DNA zu evaluieren, wurde die Relation A_{260}/A_{280} verwendet. Gut gereinigte DNA weist Werte im Bereich von 1.7 - 1.9 auf.

Das Verhältnis A_{260}/A_{280} der im Rahmen dieser Arbeit isolierten DNA betrug im Mittel 1.9 und lag damit in dem geforderten Bereich.

2.3.3.2 Polymorphismus C1236T

Die Bestimmung des SNP C1236T erfolgte mit Hilfe der PCR-CTPP-Methode und anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese. Bei Vorliegen des CC-Genotyps (Wildtyp) konnten zwei DNA-Banden mit 195 und 156 bp nachgewiesen werden und im Falle des TT-Genotyps (Mutation) wurden zwei Banden mit 195 und 79 bp detektiert. Die heterozygoten Träger zeigten drei Banden mit 195, 156 und 79 bp (siehe Abb. 2.12).

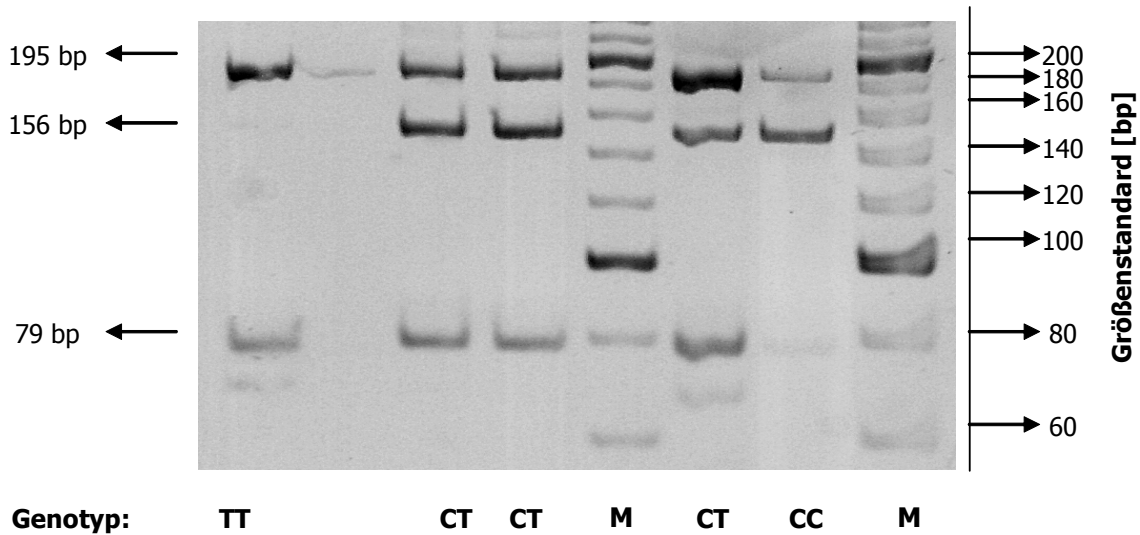


Abb. 2.12: Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Genotypen des C1236T Polymorphismus (CC = Wildtyp, TT = Mutation, M = Marker).

2.3.3.3 Polymorphismus C3435T

Die Träger des Wildtyps (CC-Genotyp) im Falle des SNP C3435T zeigten nach erfolgtem Restriktionsverdau zwei DNA-Fragmente mit 145 und 63 bp. Die amplifizierte DNA der homozygoten Träger der Mutation (TT-Genotyp) ließ sich durch Zusetzen des Restriktionsenzym nicht weiter verdauen, so dass nur eine Bande mit 208 bp zu detektieren war. Die heterozygoten Träger der Mutation zeigten wiederum alle drei Banden (siehe Abb. 2.13).

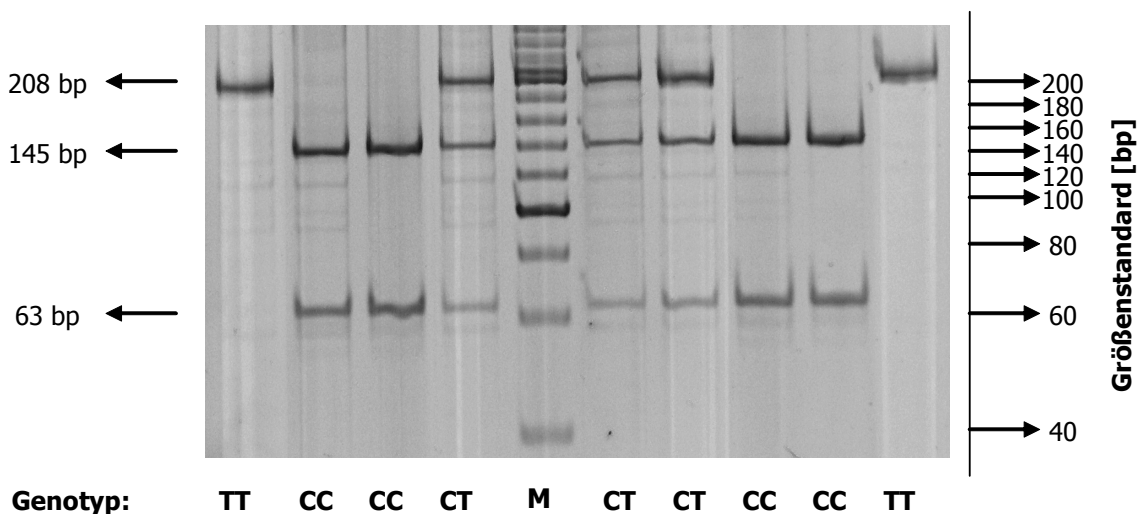


Abb. 2.13: Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Genotypen des C3435T Polymorphismus (CC = Wildtyp, TT = Mutation, M = Marker).

2.3.3.4 Polymorphismus A388G

In Abbildung 2.14 ist das Polyacrylamidgel der Genotypen des SNPs A388G dargestellt. Hier wurde zunächst ein spezifischer 218 bp-DNA-Abschnitt, der die interessierende Region des OATP-C-Gens enthält, amplifiziert. Zur Identifizierung wurde der präamplifizierte DNA-Abschnitt mit dem Restriktionsenzym *Taq* I inkubiert. Im Falle des Wildtyps (AA-Genotyp) enthielt die DNA nur eine spezifische Schnittstelle für das Restriktionsenzym, so dass zwei Banden mit 145 und 73 bp detektiert werden konnten. Im Falle der Mutation (GG-Genotyp) enthielt die DNA eine weitere spezifische Schnittstelle. Hier konnten drei DNA-Banden mit 122, 73 und 23 bp ermittelt werden. Zusätzlich zeigte das Gel immer noch eine unspezifische Bande mit 100 bp. Die heterozygoten Träger der Mutation zeigten wie erwartet vier Banden.

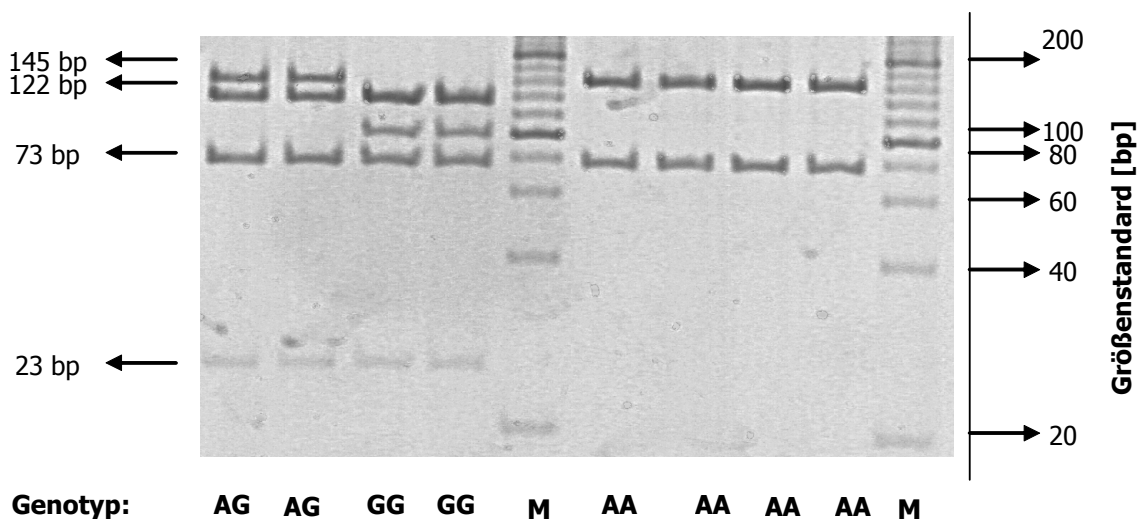


Abb. 2.14: Polyacrylamidgelelektrophorese der Genotypen des A388G Polymorphismus (AA = Wildtyp, GG = Mutation, M = Marker).

2.3.3.5 Polymorphismus G721A

Der SNP G721A konnte in dem vorhandenen Patientenkollektiv weder homozygot noch heterozygot nachgewiesen werden. Der präamplifizierte 202-bp-DNA-Abschnitt hätte bei Vorliegen der Mutation keine spezifische Schnittstelle für das eingesetzte Restriktionsenzym *Bgl* II haben dürfen, so dass nur das Ausgangsprodukt auf dem Gel sichtbar gewesen wäre. Nach erfolgter RFLP-Analyse waren jedoch immer zwei DNA-Banden mit 141 und 61 bp auf dem Gel (Abb. 2.15) zu detektieren, was eindeutig für das Vorliegen des Wildtyps (GG-Genotyp) spricht.

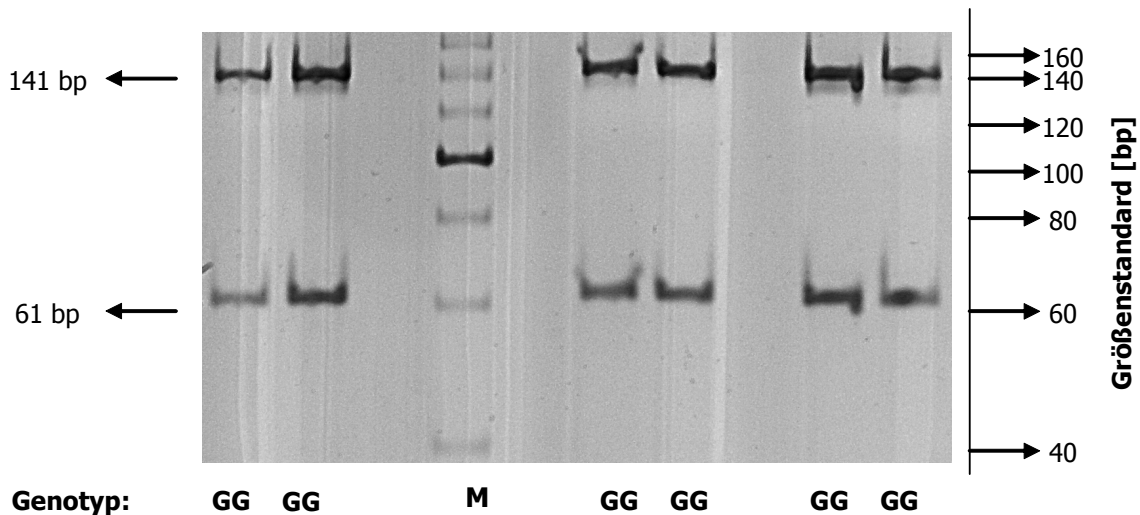


Abb. 2.15: Polyacrylamidgelelektrophorese der Genotypen des G721A Polymorphismus (GG = Wildtyp, M = Marker).

2.3.3.6 Doppelmutation OATP-C*15

Zur Identifizierung der Doppelmutation OATP-C*15 wurde im ersten Schritt eine allelspezifische PCR (ARMS-PCR) durchgeführt. Mit diesem Schritt wurde überprüft, ob der SNP T521C der Doppelmutation vorliegt. Liegt er homozygot vor, so sollte ein 1945 bp-großes PCR-Produkt nur mit dem zugesetzten MT-Primer gebildet werden können. Bei heterozygotem Vorliegen sollte ein 1945 bp-großes PCR-Produkt sowohl mit dem MT-Primer als auch mit dem WT-Primer entstehen. In Abbildung 2.16 (A) ist beispielhaft ein Agarosegel für diesen Schritt dargestellt. Patient „GS“ zeigt das PCR-Produkt mit beiden Primern, während die Patienten „GK“ und „MH“ nur ein Produkt mit dem WT-Primer zeigen. Im nächsten Schritt konnte mittels der RFLP-Analyse der amplifizierten Produkte festgestellt werden, ob zusätzlich zum T521C SNP auch noch der A388G SNP vorkommt. Nur wenn beide SNPs auf einem Allel zu finden sind, spricht man von der Doppelmutation OATP-C*15. In Abbildung 2.16 (B) ist ein Polyacrylamidgel nach erfolgtem *Taq-I*-Verdau dargestellt. Innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs sind zwei Genotypen 1*a/*15 und 1*b/*15 aufgetreten. Für den Genotyp 1*a/*15 konnten insgesamt fünf Fragmente gefunden werden. Mit dem WT-Primer entstanden Produkte mit 1845 und 70 bp und mit dem MT-Primer mit 1875, 47 und 23 bp. Für den Genotyp 1*b/*15 konnten insgesamt sechs Fragmente detektiert werden. Für beide Primer (WT und MT) entstanden jeweils Produkte mit 1875, 47 und 23 bp.

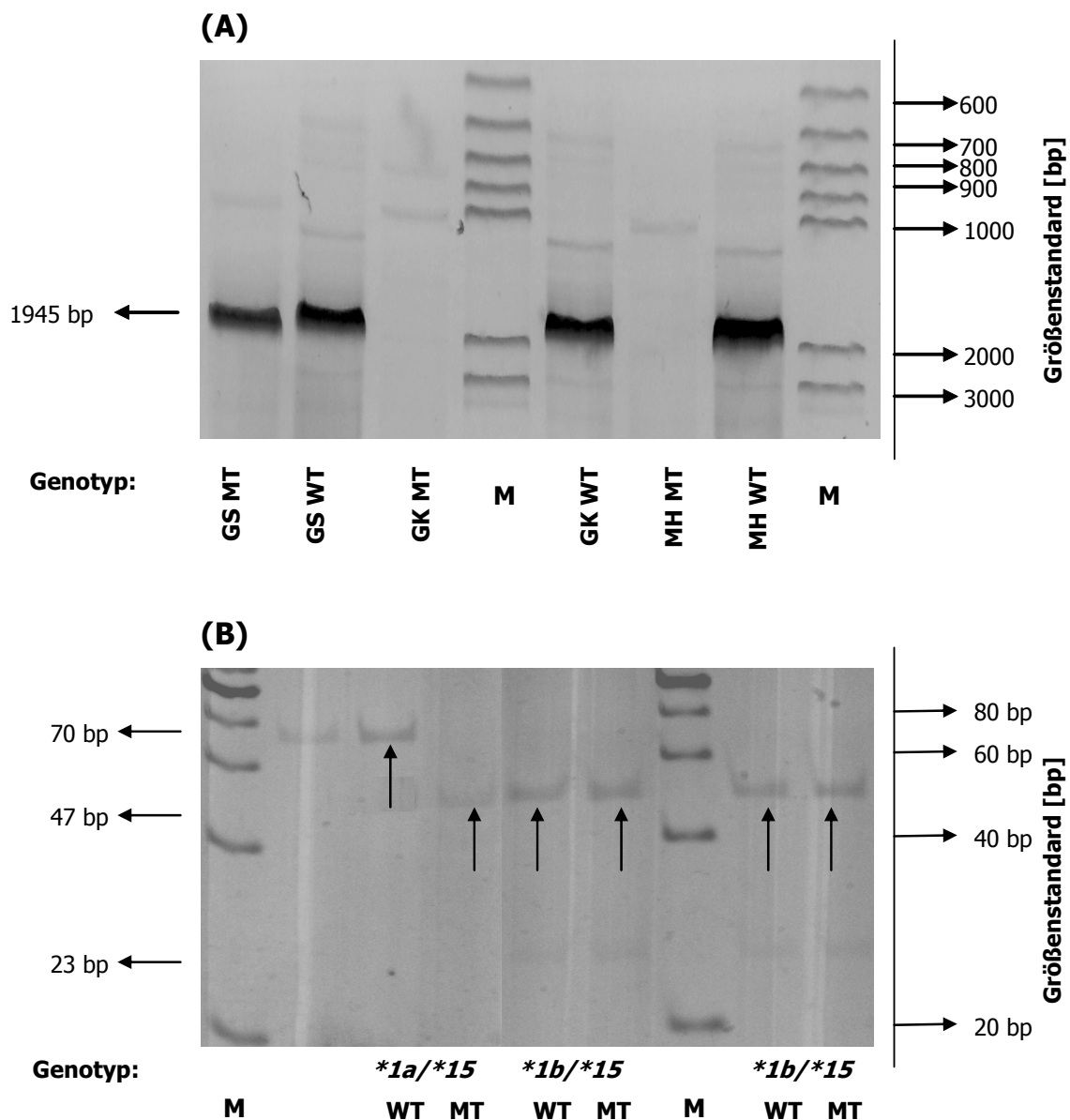


Abb. 2.16: Gelelektrophoresen der Genotypen des OATP-C*15 Polymorphismus; (A) Zwischenprodukte nach der ARMS-PCR (MT = MT-Primer, WT = WT-Primer, M = Marker); (B) Ausschnitt der erhaltenen Produkte nach erfolgtem Restriktionsverdau.

2.3.3.7 Polymorphismus UGT1A1*28

Die Identifizierung des Dinukleotid-Polymorphismus UGT1A1*28 erfolgte durch Amplifikation des interessierenden Genabschnitts und anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 2.17). Im Falle des Wildtyps A (TA)_{6/6} TAA konnte ein DNA-Fragment mit 71 bp gefunden werden. Bei heterozygotem Vorliegen der Mutation A (TA)_{6/7} TAA wurden zwei Fragmente mit 71 und 73 bp ermittelt. Eine homozygote Mutation A (TA)_{7/7} TAA konnte innerhalb der untersuchten Proben nicht gefunden werden.

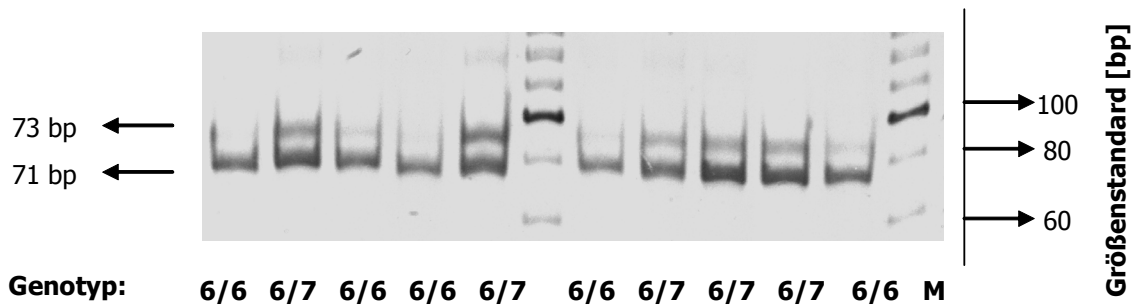


Abb. 2.17: Gelelektrophorese der Genotypen des UGT1A1*28 Polymorphismus (6/6 = Wildtyp, 6/7 = heterozygote Mutation, M = Marker).

2.3.3.8 Genotypisierung der Patienten

Fünf SNPs und zwei Dinukleotid-Polymorphismen in drei Genen, wurden auf einen Einfluss auf die Irinotecan-Pharmakokinetik hin analysiert. In dem untersuchten Patientenkollektiv konnten alle Polymorphismen bis auf den SNP G721A des OATP-C-Gens gefunden werden.

In Tabelle 2.8 sind die Einzelergebnisse der Genotypisierung für jeden Patienten aufgelistet.

Tabelle 2.9 gibt Aufschluss über die Genotyp- und Allel-Frequenzen der untersuchten Gene. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass der SNP C1236T bei 85% der untersuchten Patienten vorliegt, das entspricht einer Allel-Frequenz von 58%. Der SNP C3435T wurde mit einer etwas höheren Allel-Frequenz von 68% bei ebenfalls 85% der Patienten gefunden. Polymorphismen im OATP-C-Gen treten bei insgesamt 65% der untersuchten Patienten auf; 30% der SNP-tragenden Patienten zeigen den SNP A388G (OATP-C*1b) und 10% den SNP OATP-C*15, in 25% der Fälle treten beide SNPs gleichzeitig auf. Die Allel-Frequenz für den Genotyp OATP-C*1b/*1b liegt bei 30% und die für den Genotyp OATP-C*15/*15 bei 18%. Der homozygote Genotyp des UGT1A1*28 Dinukleotid-Polymorphismus (7/7) konnte im untersuchten Patientenkollektiv nicht gefunden werden. 75% der Patienten zeigten die Mutation aber in heterozygoter Ausprägung. Das entspricht einer Allel-Frequenz von 38%. Die Verteilung der Genotypen bei jedem der untersuchten Polymorphismen folgt nicht dem Hardy-Weinberg-Gesetz.

Tab. 2.8: Einzelergebnisse der Genotypisierung.

Patient [Abk.]	P-gp (MDR-1; ABCB1)		OATP-C/OATP1B1 (SLC21A6/SLCO1B1)				UGT1A1
	1236 C>T	3435 C>T	388 A>G	521 T>C	721 G>A	OATP-C*15	UGT1A1*28
WJ	CT	CT	GG	TC	GG	ja	6/7
HT	CT	CT	AG	TC	GG	ja	6/7
LM	CC	CC	AG	TT	GG	-	6/7
PF	CT	TT	AA	TT	GG	-	6/7
UB	TT	TT	GG	TC	GG	ja	6/7
RO	TT	TT	AG	TT	GG	-	6/7
GS	TT	CT	AG	TC	GG	ja	6/7
HW	CT	CT	GG	TC	GG	ja	6/6
MH	CT	CT	AA	TT	GG	-	6/7
GK	CT	CC	AA	TT	GG	-	6/7
KR	CT	TT	AA	TT	GG	-	6/7
US	TT	TT	AA	TT	GG	-	6/6
HTö	CC	TT	AG	TT	GG	-	6/7
HV	CC	TT	AA	TT	GG	-	6/7
RF	CT	CT	GG	TC	GG	ja	6/7
DJ	CT	CC	AG	TT	GG	-	6/6
RB	CT	CT	GG	TC	GG	ja	6/6
PS	TT	TT	AA	TT	GG	-	6/6
AP	CT	TT	AG	TT	GG	-	6/7
GM	TT	TT	GG	TT	GG	-	6/6

Tab. 2.9: Genotyp- und Allel-Frequenzen der untersuchten Gene.

Genotyp	Anzahl Patienten [n=20]	Allel- Frequenzen [%] (95% KI)*
ABCB1 1236 CC	3 (15%)	42.5 (27.2 - 57.8)
ABCB1 1236 CT	11 (55%)	
ABCB1 1236 TT	6 (30%)	57.5 (42.2 - 72.8)
ABCB1 3435 CC	3 (15%)	32.5 (18.0 - 47.0)
ABCB1 3435 CT	7 (35%)	
ABCB1 3435 TT	10 (50%)	67.5 (53.0 - 82.0)
OATP-C*1a / OATP-C*1a	7 (35%)	52.5 (37.0 - 68.0)
OATP-C*1a / OATP-C*1b	5 (25%)	
OATP-C*1b / OATP-C*1b	1 (5%)	30.0 (14.5 - 45.5)
OATP-C*1a / OATP-C*15	2 (10%)	
OATP-C*1b / OATP-C*15	5 (25%)	
OATP-C*5 / OATP-C*5	0	0
OATP-C*5 / OATP-C*15	0	0
OATP-C*15 / OATP-C*15	0	17.5 (2.0 - 33.0)
OATP-C*1c / OATP-C*1c	0	0
UGT1A1 (TA)₆ / (TA)₆	6 (30%)	65 (50.2 - 79.8)
UGT1A1 (TA)₆ / (TA)₇	14 (70%)	
UGT1A1 (TA)₇ / (TA)₇	0	35 (20.2 - 49.8)

*Die Berechnung der 95%-Konfidenzintervalle erfolgte mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes.

2.3.4 Individuelle Pharmakokinetik von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pharmakokinetik von CPT-11, SN-38 und SN-38-Glucuronid nach Applikation fünf verschiedener Dosierungen von Irinotecan untersucht. Dazu wurden je neun bis zehn Blutproben pro Patient gesammelt und mittels einer validierten HPLC-Methode (Kap. 2.2.2.2) die CPT-11-, SN-38- und SN-38-G-Konzentrationen im Plasma bestimmt.

In dem folgenden Kapitel 2.3.4.1 sind die Konzentrations-Zeit-Kurven für die drei Analyten dargestellt. Für die Erstellung der Mittelwertskurven wurden die im Abnahmeprotokoll vorgesehenen theoretischen Entnahmezeitpunkte zugrunde gelegt. Zu der Standardabweichung der eingezeichneten Kurvenpunkte trägt also neben den interindividuellen Unterschieden auch die Variation der tatsächlichen Abnahmezeitpunkte (relative Standardabweichung zwischen 1 und 2%) bei.

Für die pharmakokinetische Auswertung der ermittelten Daten wurde eine kompartmentunabhängige Datenanalyse durchgeführt.

Im Zeitraum von Januar 2005 bis Februar 2006 wurden 20 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, deren Charakteristika in Tabelle 2.2 (s. Kap. 2.2.4.2) dargestellt sind. Die Patienten (6 Frauen und 14 Männer) litten an verschiedenen Tumorentitäten und wurden mit unterschiedlichen irinotecanhaltigen Kombinationstherapien behandelt, bei denen Irinotecan in Dosen zwischen 50 und 180 mg/m² appliziert wurde. Die Patienten waren z.T. mit anderen Chemotherapieprotokollen vorbehandelt. Das mediane Alter der Patienten betrug 66 Jahre (48 - 85 Jahre).

2.3.4.1 Konzentrations-Zeit-Profile

In Abbildung 2.18 sind die Konzentrations-Zeit-Profile für die drei untersuchten Analyten CPT-11 und seine beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G und die jeweils applizierten Dosierungen dargestellt. In die Mittelwertskurve der 180 mg/m²-Dosierung sind 14 Patienten eingegangen. Drei Patienten konnten in die Mittelwertskurve der 125 mg/m²-Dosierung eingeschlossen werden. Die Konzentrations-Zeit-Profile der drei weiteren Dosierungen (135, 100 und 50 mg/m²), stellen die individuellen Plasmaverläufe der jeweils mit der Dosierung behandelten Patienten dar.

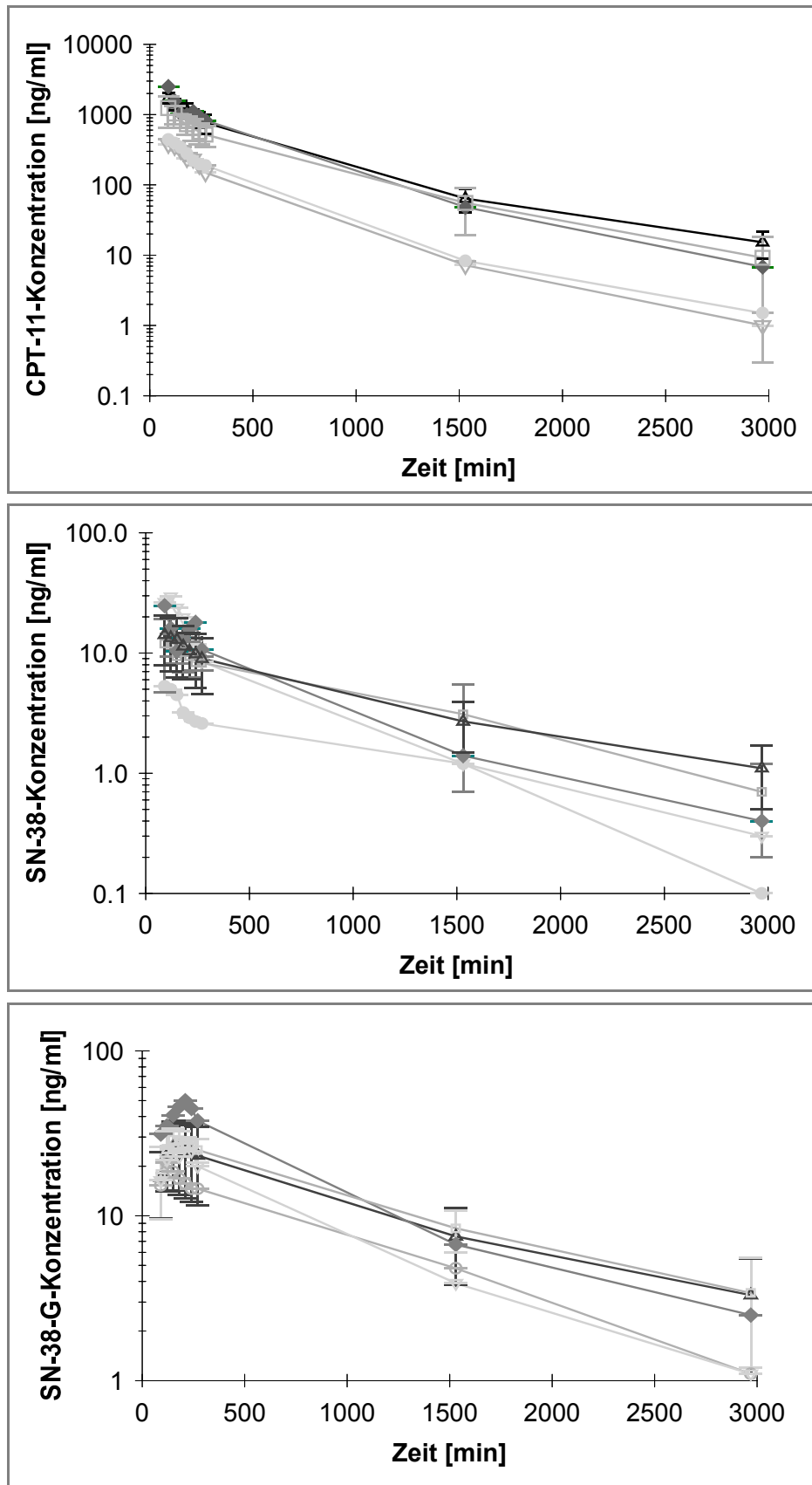


Abb. 2.18: Mittlerer CPT-11-, SN-38- und SN-38-G-Konzentrations-Zeit-Verlauf im Plasma nach Applikation von 180 mg/m² (Δ), 135 mg/m² (\blacklozenge), 125 mg/m² (\square), 100 mg/m² (\bullet) und 50 mg/m² (∇) Irinotecan.

Durch die halblogarithmische Darstellungsweise wird der mehrphasige Verlauf aller Konzentrations-Zeit-Profile deutlich. In der ersten Phase nach Erreichen der maximalen Konzentrationen fallen die Plasmaspiegel zunächst rasch ab und gehen danach in eine lineare Eliminationsphase über. Die Abnahme der Konzentration in jedem der dargestellten Profile, steht in Übereinstimmung mit einem 2- oder 3-Kompartimentmodell.

Die maximalen Plasmakonzentrationen von CPT-11 wurden jeweils am Ende der 90-minütigen Infusion erreicht und lagen bei 1741.3 ± 295.0 ng/ml für die Patienten der 180 mg/m^2 -Dosierung und bei 1306.1 ± 496.0 ng/ml für die Patienten der 125 mg/m^2 -Dosierung. Die Patientin, welche die 135 mg/m^2 -Infusion erhalten hatte, zeigte einen sehr hohen Plasmaspiegel von 2502.0 ng/ml und übertraf damit die C_{max} -Werte aller Patienten der höheren Dosierung. Die maximalen Plasmaspiegel der beiden Patienten, die 50 bzw. 100 mg/m^2 appliziert bekommen haben, waren bei 400 ng/ml zu detektieren. Bei einigen Patienten konnte, beim Betrachten der individuellen Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven, ca. 1 - 1.5 Stunden nach dem Ende der Infusion ein kurzfristiges Wiederansteigen der CPT-11-Plasmakonzentration festgestellt werden, welches auf den enterohepatischen Kreislauf des Irinotecans zurückzuführen ist (Kehrer *et al.*, 2000) Die Streuungen der Konzentrationen in der 180 mg/m^2 -Gruppe waren mit relativen Standardabweichungen von 26% am geringsten ausgeprägt, in der 125 mg/m^2 -Gruppe ergab sich eine mittlere relative Standardabweichung von 43%. Die starken Streuungen sind in erster Linie auf die hohe interindividuelle Variabilität zurückzuführen.

Die maximalen Plasmakonzentrationen von SN-38 und SN-38-G konnten im Durchschnitt 2 - 3 Stunden nach Ende der Infusion ausgemacht werden. Die Mittelwerte für C_{max} in der 180 mg/m^2 -Gruppe lagen für SN-38 bei 15.8 ± 6.9 und für SN-38-G bei 27.3 ± 12.0 ng/ml. In der 125 mg/m^2 -Gruppe konnten Maximalwerte von 13.8 ± 5.3 für SN-38 und 29.7 ± 3.6 ng/ml für SN-38-G detektiert werden und waren damit den Werten der höheren Dosierung sehr ähnlich. Auffällig ist, dass der Patient mit der 50 mg/m^2 -Infusion mit einer maximalen SN-38-Plasma-Konzentration von 29.5 ng/ml einen fast sechsmal höheren Wert, als der Patient mit der 100 mg/m^2 -Infusion erreichte. Diese Beobachtung lässt auch hier auf eine hohe interindividuelle Variabilität schließen. Die Streuungen der Konzentrationen von SN-38 und SN-38-G sind mit relativen Standardabweichungen von 48% und 49% für die 180 mg/m^2 -Gruppe und mit 38% und 26% für die 125 mg/m^2 -Gruppe sehr hoch.

Die Abnahme der Konzentrationen für alle Dosierungen nach der C_{\max} in den folgenden Stunden bzw. Tagen erfolgte für CPT-11 am schnellsten. Drei Stunden nach Ende der Infusion waren noch 43% und 24 bzw. 48 Stunden nach Ende der Infusion noch 4 bzw. 1% der C_{\max} zu detektieren. Im Falle von SN-38 konnten zu den beiden späteren Zeitpunkten noch 18 und 7% und im Falle des Glucuronids sogar noch 41 und 17% der Maximalkonzentration gemessen werden.

2.3.4.2 Vergleich der pharmakokinetischen Parameter für die verschiedenen Dosierungen des Irinotecans

Im folgenden Kapitel sind die Parameter von CPT-11, SN-38 und SN-38-G, die durch pharmakokinetische Analyse der Konzentrations-Zeit-Verläufe erhalten wurden, auf ihre Dosisabhängigkeit und damit auf eine lineare Pharmakokinetik überprüft worden. Von einer linearen Pharmakokinetik spricht man, wenn alle Plots der Plasmadaten für Arzneistoff und Metabolit nach Division durch die Dosis superimponierbar sind. In diesem Falle kann davon ausgegangen werden, dass Geschwindigkeitskonstanten, Clearance und Verteilungsvolumen unabhängig von der applizierten Dosis sind (Derendorf *et al.*, 2002).

Zunächst soll auf die Ergebnisse des CPT-11 eingegangen werden. Korrelierte man die individuellen C_{\max} -Werte der Patienten mit der jeweils applizierten Dosis, so konnte trotz der hohen beobachteten interindividuellen Variabilität und der kleinen Fallzahl der Patienten bei den untersuchten Dosierungen ein mittelstarker proportionaler Zusammenhang der beiden Parameter mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.65$ ($p < 0.05$) festgestellt werden (Abb. 2.19).

Die AUC als dosisabhängiger Parameter zeigte eine ebenfalls positive Korrelation mit der applizierten Dosis. Der Korrelationskoeffizient für die $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ lag bei $r = 0.71$ ($p < 0.05$) und deutete somit auf einen etwas stärkeren Zusammenhang hin, der in Abbildung 2.20 ersichtlich wird. Die Parameter Verteilungsvolumen, Clearance und Halbwertszeit zeigten keine signifikante Abhängigkeit von der applizierten Dosis. Die Korrelationskoeffizienten wurden bestimmt mit $r = -0.22$, -0.41 und 0.49 .

Für CPT-11 konnte somit eine lineare Pharmakokinetik nachgewiesen werden.

Für die pharmakokinetischen Parameter von SN-38 konnten mittels der erhobenen Daten keine Zusammenhänge mit der applizierten Dosis gefunden werden. Lediglich für die Halbwertszeit des Metaboliten konnte eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.53$ ($p < 0.05$) evaluiert werden.

Eine Beziehung zwischen der AUC der Muttersubstanz und der des Metaboliten konnte nicht festgestellt werden.

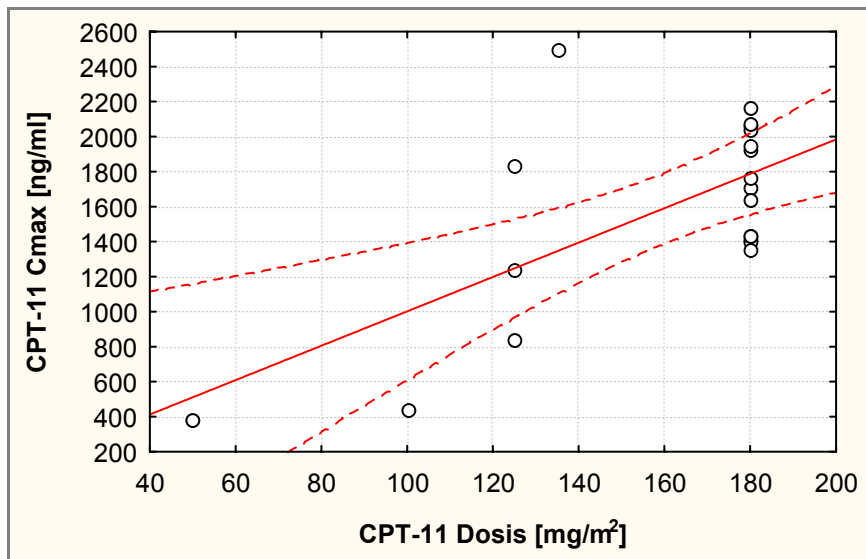


Abb. 2.19: Zusammenhang zwischen der jeweils applizierten Dosis und den ermittelten C_{max} -Werten von CPT-11 ($n = 20$, \circ individuell bestimmte C_{max} -Werte, ---- 95%-Konfidenzintervall).

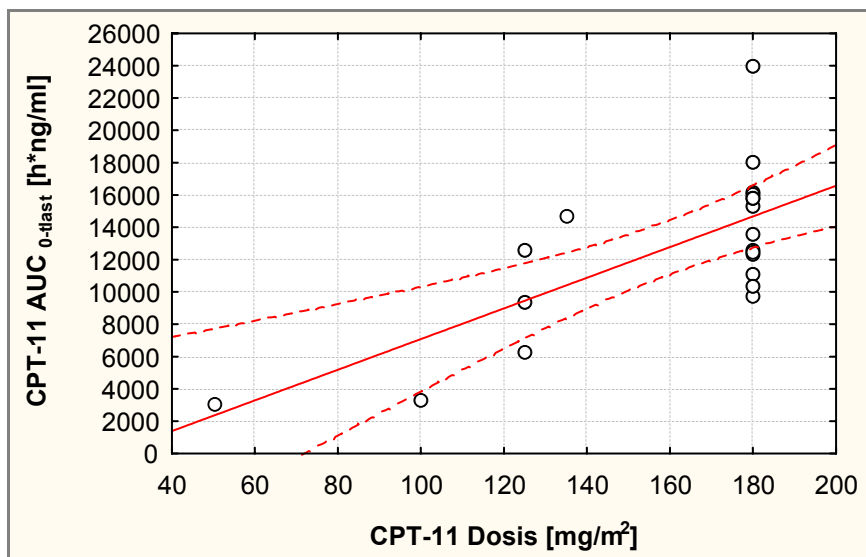


Abb. 2.20: Zusammenhang zwischen der jeweils applizierten Dosis und den ermittelten $AUC_{0-tlast}$ -Werten von CPT-11 ($n = 20$, \circ individuell bestimmte AUC -Werte, ---- 95%-Konfidenzintervall)

Keine Korrelation bestand zwischen der applizierten Dosis und den Parametern des SN-38-G. Eine Beziehung zwischen der AUC der Muttersubstanz und der des SN-38-G konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Es konnte aber ein signifikanter Zusammenhang zwischen der AUC des SN-38 und der des glucuronidierten Metaboliten mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.50$ eruiert werden (Abb. 2.21).

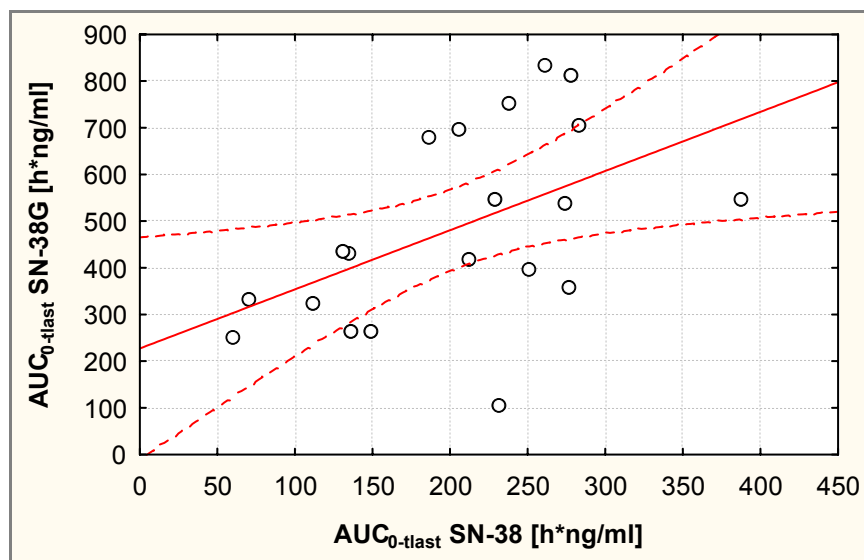


Abb. 2.21: Zusammenhang zwischen der AUC des Metaboliten SN-38 mit der des glucuronidierten Metaboliten SN-38-G. ($n = 20$, \circ individuell bestimmte AUC-Werte, ----- 95%-Konfidenzintervall).

2.3.4.3 Individuelle pharmakokinetische Parameter

Die Einzelergebnisse der pharmakokinetischen Parameter sind in den nachfolgenden Tabellen für Irinotecan, SN-38 und SN-38-Glucuronid dargestellt.

Tabelle 2.10 zeigt die individuellen Ergebnisse der modellunabhängigen Datenanalyse für Irinotecan. Da für CPT-11 eine lineare Pharmakokinetik nachgewiesen werden konnte, dürfen die Ergebnisse der dosisabhängigen Parameter (C_{\max} und $AUC_{0-tlast/0-t\infty}$) zur Bestimmung der Variabilität nur innerhalb der jeweiligen Dosierungsgruppe verglichen werden, während die dosisunabhängigen Parameter ($t_{1/2}$, $AUC_{Dosis0-t\infty}$, CL und V_z) über das gesamte Patientenkollektiv verglichen werden können.

Insgesamt wurde für jeden der hier betrachteten Parameter eine hohe interindividuelle Variabilität beobachtet. Für die $AUC_{Dosis0-t\infty}$ beispielsweise, wurden Werte zwischen 50.9 und 133.9 $h \cdot m^2 \cdot ng/ml/mg$ evaluiert; der Mittelwert betrug

79.1 h*m²*ng/ml/mg. Die interindividuelle Variabilität konnte mit einer relativen Standardabweichung von 29.4% berechnet werden. Die mittleren C_{max}-Werte für die untersuchten Gruppen wurden bereits in Kapitel 2.3.4.1 präsentiert. Für das Verteilungsvolumen von Irinotecan wurde ein mittlerer Wert von 146.6 ± 43.1 l/m² erhalten, die Variabilität konnte mit 29.4% bestimmt werden. In Bezug auf die Elimination wurde die Gesamtkörperclearance untersucht, diese machte 13.9 ± 4.9 l/h/m² mit einer relativen Standardabweichung von 35% aus. Die terminale Halbwertszeit für CPT-11 lag im Mittel bei 7.4 ± 0.9 Stunden und die mittlere Verweildauer bei 6.3 ± 0.8 Stunden. Damit zeigten die beiden Parameter mit einer relativen Standardabweichung von 11% die geringste Variabilität unter den betrachteten Größen.

Tabelle 2.11 zeigt die individuellen Parameter für SN-38. Die maximalen detektierbaren Plasmakonzentrationen lagen zwischen 5.3 und 28.1 ng/ml. Die relative Standardabweichung betrug dabei 46%. Die AUC, die wie in Kapitel 2.3.4.2 gezeigt wurde, unabhängig von der applizierten Dosis war, zeigte eine Variabilität mit einer relativen Standardabweichung von 40%. Der Mittelwert der individuellen AUC_{0-tlast}-Werte betrug 204.7 ± 82.4 h*ng/ml mit einem Bereich von 59.7 - 387.2 h*ng/ml. Die terminale Halbwertszeit von SN-38 in der Gruppe, die Irinotecan in einer reduzierten Dosis (50 – 135 mg/m²) erhalten hat, lag bei 10.8 ± 3.0 Stunden und in der Gruppe, die Irinotecan in der 180 mg/m²-Dosierung appliziert bekam, bei 14.2 ± 2.8 Stunden. Der Unterschied zwischen den beiden Halbwertszeiten war statistisch signifikant (p = 0.02). Beide Halbwertszeiten waren, wie erwartet, länger als die der Muttersubstanz. Die mittlere Verweildauer ergab ähnliche Ergebnisse, wie die Halbwertszeit.

Die Einzelergebnisse der pharmakokinetischen Datenanalyse von SN-38-G sind in Tabelle 2.12 aufgeführt. Die maximalen Plasmaspiegel der Patienten, die eine reduzierte Irinotecan-Dosis (135 - 50 mg/m²) erhalten haben, unterscheiden sich nicht von denen der Patienten mit höherer Irinotecan-Dosis. Für die AUC_{0-tlast}-Werte, die wie nachgewiesen dosisunabhängig waren, errechnete sich ein Mittelwert von 531.5 ± 218.2 h*ng/ml und zeigte damit eine hohe Variabilität von 41%. Die mittlere terminale Halbwertszeit lag bei 14.2 ± 3.9 h und die mittlere Verweilzeit bei 13.3 ± 2.2 h.

Tab. 2.10: Einzelergebnisse der pharmakokinetischen modellunabhängigen Datenanalyse von CPT-11 sortiert nach der applizierten Irinotecan-Dosis.

Patient [Abk.]	CPT-11- Dosis [mg/m²]	t_{1/2} [h]	C_{max} [ng/ml]	AUC_{0-tlast} [h*ng/ml]	AUC_{0-t∞} [h*ng/ml]	AUC_{Dosis 0-t∞} [h*m²*ng/ ml/mg]	AUC extrapol. [%]	Cl_{0-tlast} [l/h/m²]	MRT_{0-tlast} [h]	Vz_{0-tlast} [l/m²]
PS	50	6.0	379.7	3052.7	3061.4	61.2	0.3	16.3	5.2	141.6
AP	100	6.4	442.2	3396.9	3410.7	34.1	0.4	29.3	5.1	269.7
GM	125	6.9	843.1	6316.2	6361.0	50.9	0.7	19.7	6.2	195.9
HW	125	6.9	1245.7	9457.0	9492.6	75.9	0.4	13.2	6.3	130.3
KR	125	8.6	1829.6	12683.8	12924.7	103.4	1.9	9.7	7.5	119.5
MH	135	6.5	2502.0	14758.5	14822.0	109.8	0.4	9.1	5.4	85.1
DJ	180	7.6	1923.9	16227.4	16384.8	91.0	1.0	11.0	6.0	120.9
GK	180	8.0	1708.3	12597.8	12795.9	71.1	1.6	14.1	7.5	163.9
GS	180	6.8	1414.4	12384.2	12435.0	69.1	0.4	14.5	6.2	141.5
HT	180	9.1	1760.4	16100.4	16455.6	91.4	2.2	10.9	7.6	142.9
HTö	180	8.1	2169.0	15296.3	15493.7	86.1	1.3	11.6	7.1	135.7
HV	180	8.9	1403.0	15909.6	16244.8	90.3	2.1	11.1	7.7	142.9
LM	180	7.6	1641.2	11121.7	11267.3	62.6	1.3	16.0	6.1	176.2
PF	180	7.3	1949.2	15838.3	15950.3	88.6	0.7	11.3	5.9	119.2
RB	180	6.3	2063.0	23962.9	24101.0	133.9	0.6	7.5	6.4	67.8
RF	180	7.5	1437.1	13622.9	13784.2	76.6	1.2	13.1	6.6	141.4
RO	180	7.3	1435.3	9838.9	9960.1	55.3	1.2	18.1	5.9	190.5
UB	180	8.0	2041.1	18135.1	18353.8	102.0	1.2	9.8	6.1	112.9
US	180	8.3	2075.2	12468.0	12667.9	70.4	1.6	14.2	6.2	169.0
WJ	180	6.7	1356.4	10400.5	10456.1	58.1	0.5	17.2	5.2	165.2

Tab. 2.11: Einzelergebnisse der pharmakokinetischen modellunabhängigen Datenanalyse von SN-38 sortiert nach der applizierten Irinotecan-Dosis.

Patient [Abk.]	CPT-11- Dosis [mg/m²]	t_{1/2} [h]	C_{max} [ng/ml]	t_{max} [h]	AUC_{0-tlast} [h*ng/ml]	AUC_{0-t∞} [h*ng/ml]	AUC_{extrapol.} [%]	MRT_{0-tlast} [h]	REC* AUC_{SN-38}/ AUC_{CPT-11}
PS	50	8.4	29.5	2.0	211.5	215.1	1.7	7.5	0.069
AP	100	9.9	5.3	1.5	70.1	71.5	2.0	12.7	0.021
GM	125	9.5	11.0	3.0	133.8	137.9	3.0	9.6	0.021
HW	125	12.2	10.6	2.0	185.6	194.4	4.5	11.8	0.020
KR	125	16.1	19.9	1.5	272.9	303.1	10.0	14.8	0.022
MH	135	8.5	24.8	1.5	204.7	209.6	2.3	7.9	0.014
DJ	180	12.3	5.8	2.0	59.7	63.2	5.6	12.3	0.004
GK	180	12.2	18.3	2.5	260.0	281.0	7.5	11.8	0.021
GS	180	11.7	11.0	1.5	276.6	283.4	2.4	15.9	0.022
HT	180	11.7	14.5	2.0	228.3	236.7	3.6	13.8	0.014
HTö	180	18.1	21.2	1.5	282.0	331.6	15.0	14.2	0.018
HV	180	17.6	20.3	2.0	277.6	326.8	15.1	13.7	0.017
LM	180	19.2	8.5	4.0	148.7	184.7	19.5	13.5	0.013
PF	180	12.0	28.1	2.5	387.2	413.2	6.3	10.4	0.024
RB	180	12.0	22.4	1.5	231.2	246.9	6.3	10.6	0.010
RF	180	17.8	8.2	1.5	110.7	128.7	13.9	14.5	0.008
RO	180	12.2	8.1	1.5	134.8	145.3	7.2	12.1	0.014
UB	180	12.0	16.1	3.1	237.8	256.9	7.4	10.6	0.013
US	180	14.8	14.1	1.5	129.7	141.8	9.0	13.2	0.010
WJ	180	15.4	23.9	1.5	250.1	292.3	14.4	11.7	0.024

*relative extent of conversion = Metabolisierungsquotient.

Tab. 2.12: Einzelergebnisse der pharmakokinetischen modellunabhängigen Datenanalyse von SN-38-G sortiert nach der applizierten Irinotecan-Dosis.

Patient [Abk.]	CPT-11- Dosis [mg/m²]	t_{1/2} [h]	C_{max} [ng/ml]	t_{max} [h]	AUC_{0-tlast} [h*ng/ml]	AUC_{0-t∞} [h*ng/ml]	AUC_{extrapol.} [%]	MRT_{0-tlast} [h]	REG* AUC_{SN-38-G}/ AUC_{SN-38}
PS	50	10.1	27.4	3.5	422.1	438.1	3.7	10.4	2.0
AP	100	12.0	21.1	2.0	334.6	353.7	5.3	12.5	4.8
GM	125	11.0	26.3	3.5	434.6	456.9	4.9	11.7	3.2
HW	125	11.1	33.4	2.5	682.4	703.2	3.0	12.8	3.7
KR	125	14.8	29.5	2.5	541.9	610.0	11.2	14.5	2.0
MH	135	10.8	49.9	3.5	696.6	735.4	5.3	10.3	3.4
DJ	180	9.9	13.1	2.5	251.2	258.4	2.8	11.3	4.2
GK	180	20.2	39.2	2.5	837.5	1084.7	22.8	15.6	3.2
GS	180	10.7	21.5	2.5	360.8	373.2	3.3	11.6	1.3
HT	180	25.0	20.2	4.0	548.6	725.3	24.4	19.4	2.4
HTö	180	16.6	30.4	3.0	707.2	810.4	12.7	15.0	2.5
HV	180	16.6	36.1	2.5	813.9	950.3	14.4	14.5	2.9
LM	180	15.6	12.9	2.5	265.0	303.3	12.6	14.3	1.8
PF	180	17.2	24.1	3.0	547.2	631.7	13.4	15.6	1.4
RB	180	10.1	54.1	4.0	1006.6	1047.3	3.9	11.5	4.4
RF	180	14.6	16.9	2.0	324.8	364.9	11.0	13.8	2.9
RO	180	13.2	16.0	3.0	264.5	296.9	10.9	12.0	2.0
UB	180	15.1	39.2	3.0	754.1	860.6	12.4	12.9	3.2
US	180	16.4	25.6	2.0	436.7	505.4	13.6	14.7	3.4
WJ	180	12.5	33.0	2.0	400.3	436.5	8.3	11.8	1.6

*relative extent of glucuronidation = Metabolisierungsquotient.

2.3.4.4 Untersuchung der Metabolisierungskapazität für CPT-11 und SN-38

Das relative Ausmaß der Umwandlung von CPT-11 zum eigentlich aktiven Metaboliten SN-38 kann aus dem Quotienten AUC_{SN-38}/AUC_{CPT-11} berechnet werden. Es handelt sich dabei um einen sogenannten Metabolisierungsquotienten, der auch REC-Wert (*relative extent of conversion*) genannt wird (Ma *et al.*, 2000). Mit Hilfe dieses Quotienten kann ermittelt werden wieviel der Muttersubstanz zu SN-38 metabolisiert wird. Dabei gilt, je mehr SN-38 gebildet wird, desto effektiver ist die Therapie (Danks *et al.*, 1999).

Die individuellen REC-Werte der Patienten sind in Tabelle 2.11 aufgeführt. Beim Vergleich der REC-Werte für die unterschiedlichen Applikationen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden. Die REC-Werte lagen im Mittel bei 0.015 ± 0.006 , wobei aber auch hier eine hohe interindividuelle Variabilität mit einer relativen Standardabweichung von 41% ausgemacht werden konnte. Z.B. errechnete sich für den Patienten „PS“ ein fast 20-fach höherer REC-Wert als für den Patienten „DJ“.

Mit Hilfe des REG-Wertes (*relative extent of glucuronidation*) kann das Ausmaß der Metabolisierung vom aktiven Metaboliten SN-38 zum glucuronidierten inaktiven Metaboliten SN-38-G bestimmt werden. Der REG-Wert wird aus dem AUC-Verhältnis $AUC_{SN-38-G}/AUC_{SN-38}$ berechnet und gestattet somit Rückschlüsse auf die Entgiftung des SN-38.

Die individuellen REG-Werte der Patienten sind in Tabelle 2.12 aufgeführt. Im Mittel betrug der Metabolisierungsquotient 2.7 ± 1.0 und war unabhängig von der applizierten Dosis. Die interindividuelle Variabilität konnte mit 37% berechnet werden.

2.3.5 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Pharmakokinetik des Irinotecans und seiner beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G

Im Folgenden werden die erhaltenen pharmakokinetischen Parameter von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G in Abhängigkeit vom Genotyp des jeweiligen untersuchten SNPs dargestellt. Es wurden die Patienten ($n = 14$), die eine Dosierung von 180 mg/m^2 erhalten haben, in die Untersuchung einbezogen, um Differenzen, die durch eine unterschiedliche Dosierung entstanden sind, ausschliessen zu können. Eine Ausnahme bildete der Irinotecan-Parameter AUC_{Dosis} , hier wurden alle 20 Patienten für die Auswertung berücksichtigt. Aufgrund der nachgewiesenen linearen Pharmakokinetik des

Irinotecans (Kap. 2.3.4.2) war es möglich die AUC-Werte auf die jeweils verabreichte Dosis zu normieren.

Zuerst werden die beiden interessierenden SNPs des MDR1-Gens (C1236T und C3435T) betrachtet, im Anschluss folgen die Untersuchung der Polymorphismen des OATP-C-Transportergens (A388G und OATP-C*15) und die Analyse des Dinukleotid-Polymorphismus des UGT1A1-Gens (UGT1A1*28).

Die Beurteilung des SNPs G721A des OATP-C-Transportergens entfällt, da keiner der rekrutierten Patienten diesen Polymorphismus aufwies. Die Analyse des SNPs T521C ergab dieselben Ergebnisse wie die Doppelmutation OATP-C*15, da sich das Patientenkollektiv für diese beiden Polymorphismen nicht unterschied.

Zur besseren Anschaulichkeit der Daten sind die Plasma-Konzentrations-Zeit-Profile für alle Metaboliten und Genotypen im Anschluss an die pharmakokinetischen Parameter des jeweiligen Polymorphismus dargestellt.

2.3.5.1 Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps C1236T

In Tabelle 2.13 sind die pharmakokinetischen Parameter in Abhängigkeit vom SNP C1236T dargestellt. In Abbildung 2.22 sind die dazugehörigen Plasma-Konzentrations-Zeit-Profile wiedergegeben.

Insgesamt trugen 79% der betrachteten Patienten den Polymorphismus in heterozygoter oder homozygoter Ausprägung.

Beim Vergleich der ermittelten Parameter in Bezug auf das CPT-11 wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Im Durchschnitt zeigten die homozygoten Träger der Mutation etwas niedrigere AUC-Werte als die Träger des Wildtyps und der heterozygoten Variante. Die Clearance der Patienten mit homozygoter Ausprägung der Mutation war, passend zu den erniedrigten AUC-Werten, leicht erhöht.

Die Ergebnisse für die beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G waren vergleichbar mit den Ergebnissen für Irinotecan. Die homozygoten Träger der Mutation zeigten auch hier niedrigere AUC-Werte als die Träger des Wildtyps. Im Falle der Halbwertszeit konnte für den aktiven Metaboliten SN-38 ein signifikanter Unterschied für die drei Genotypen ermittelt werden ($p = 0.005$). Die Halbwertszeit der homozygoten Träger des Wildtyp-Allels betrug im Mittel 18 Stunden und war damit um fast 5 Stunden länger, als die Halbwertszeit der beiden anderen Genotypen.

Die Plasma-Konzentrations-Zeit-Profile (Abb. 2.22) spiegeln die Ergebnisse bildlich wider. Besonders für die beiden Metaboliten konnte eine geringfügig kleinere AUC bei den Trägern des Genotyps TT festgestellt werden. Auffällig war hier jedoch die hohe interindividuelle Variabilität von im Mittel 40% für das SN-38 und 50% für das SN-38-G.

Tab. 2.13: Pharmakokinetische modellunabhängige Parameter von CPT-11, SN-38 und SN-38-G (MW ± Stabw. und 95% Konfidenzintervalle der Differenzen) in Abhängigkeit vom Genotyp des SNP C1236T nach Applikation von 180 mg/m² Irinotecan.

Parameter	SNP 1236 C>T			95% KI _{Diff}		
	CC [†] [n=3]	CT [†] [n=7]	TT [†] [n=4]	CC vs. CT	CC vs. TT	CT vs. TT
CPT-11-Pharmakokinetik						
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	14109.2 ± 2605.3	15535.7 ± 4292.8	13206.6 ± 3504.9	[7678.8; -4825.7]	[5403.8; -6306.4]	[3505.3; -8163.7]
AUC _{0-∞ Dosis} [h*ng/ml]*	79.6 ± 14.9	84.9 ± 26.6	68.1 ± 18.2	[43.7; -33.2]	[22.2; -33.7]	[18.1; -51.6]
t _{1/2} [h]	8.2 ± 0.7	7.5 ± 0.9	7.6 ± 0.7	[0.7; -2.1]	[0.7; -1.3]	[1.3; -1.2]
C _{max} [ng/ml]	1737.7 ± 392.0	1742.6 ± 265.3	1741.5 ± 366.0	[484.2; -474.4]	[751.7; -747.9]	[435.1; -437.3]
CL _{0-48 h} [l/h/m ²]	12.9 ± 2.7	12.1 ± 3.0	14.1 ± 3.4	[3.9; -5.4]	[7.5; -6.2]	[6.6; -2.6]
V _{Z 0-48 h} [l/m ²]	151.6 ± 21.6	131.6 ± 33.5	153.5 ± 33.7	[29.1; -69.1]	[60.3; -58.5]	[70.2; -26.5]
MRT _{0-48 h} [h]	7.0 ± 0.8	6.4 ± 0.9	6.1 ± 0.1	[0.8; -1.9]	[0.1; -1.0]	[0.7; -1.4]
SN-38-Pharmakokinetik						
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	236.1 ± 75.7	218.2 ± 106.7	194.6 ± 74.1	[140.5; -176.4]	[106.9; -190.0]	[116.3; -163.5]
t _{1/2} [h]	18.1 ± 1.0	13.3 ± 2.3	12.7 ± 1.4	[-1.5; -8.1]#	[-2.9; -8.0]#	[2.3; -3.6]
C _{max} [ng/ml]	16.7 ± 7.1	17.3 ± 8.3	12.3 ± 3.5	[13.3; -12.0]	[6.1; -14.8]	[5.2; -15.2]
MRT _{0-48 h} [h]	13.8 ± 0.4	12.2 ± 1.5	13.0 ± 2.2	[0.5; -3.8]	[2.6; -4.3]	[3.4; -1.8]
SN-38-G-Pharmakokinetik						
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	595.4 ± 291.0	559.5 ± 274.8	454.0 ± 212.1	[236.9; -565.9]	[236.9; -565.9]	[348.6; -631.2]
t _{1/2} [h]	16.3 ± 0.6	15.6 ± 5.6	13.9 ± 2.5	[7.0; -8.3]	[7.0; -8.3]	[1.4; -6.3]
C _{max} [ng/ml]	26.5 ± 12.1	28.7 ± 14.4	25.6 ± 9.9	[24.2; -19.8]	[24.2; -19.8]	[20.6; -22.4]
MRT _{0-48 h} [h]	14.6 ± 0.4	14.1 ± 3.0	12.8 ± 1.4	[3.6; -4.5]	[3.6; -4.5]	[0.4; -4.0]

*Alle 20 Patienten sind in die Untersuchung eingegangen; [†]CC = Wildtyp, CT = heterozygote Mutation, TT = Mutation, #statistisch signifikant (p < 0.05).

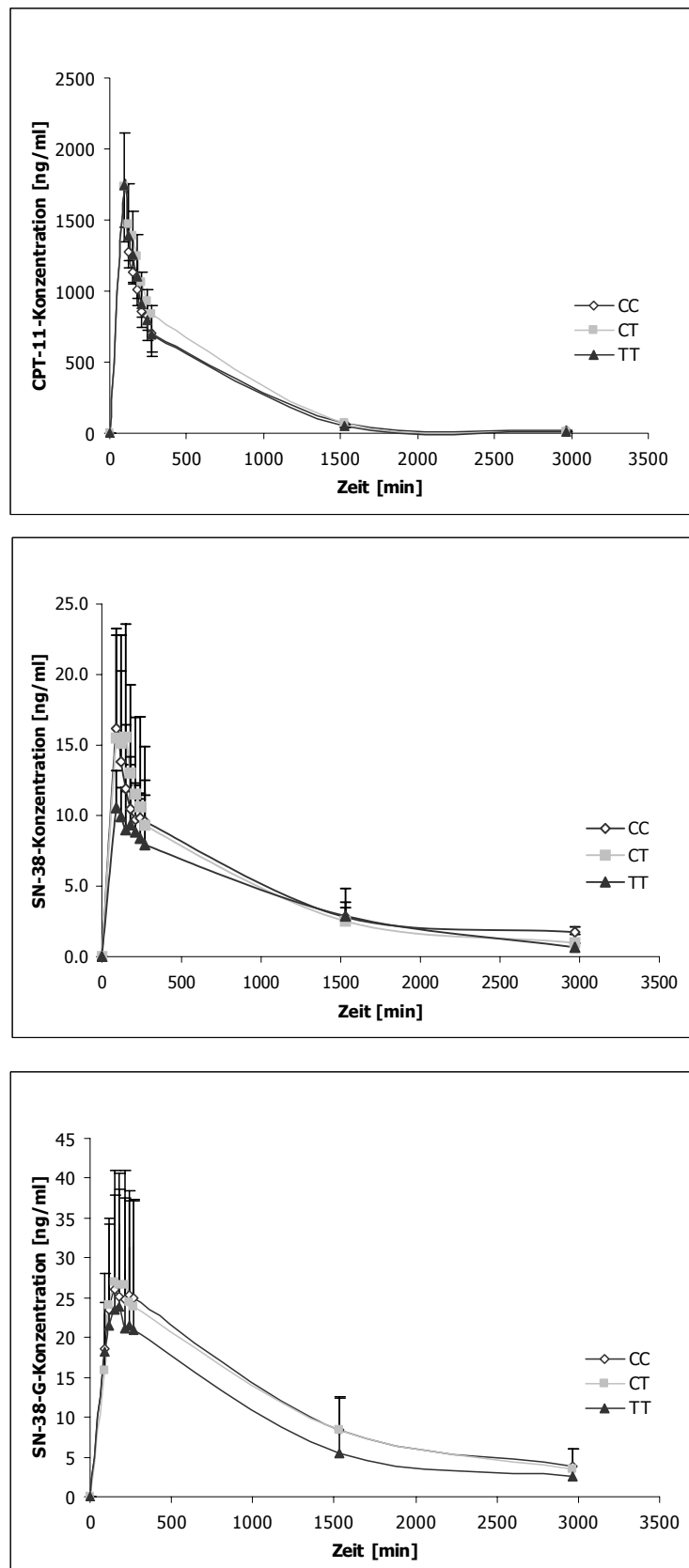


Abb. 2.22: Mittlere Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven von CPT-11, SN-38 und SN-38-G in Abhängigkeit vom Genotyp des SNPs C1236T (CC = Wildtyp, CT = heterozygote Mutation, TT = Mutation).

2.3.5.2 Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps C3435T

Die Betrachtung der pharmakokinetischen Parameter (Tab. 2.14) für die drei Genotypen des SNP C3435T ergab keine konkreten Hinweise auf einen pharmakogenetischen Zusammenhang. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede erfasst werden. Die Analyse der Plasma-Konzentrations-Zeit-Verläufe (Abb. 2.23) für Irinotecan ergab ebenfalls keinen Anhaltspunkt auf einen Unterschied zwischen den Genotypen. Lediglich die Betrachtung der Mittelwertskurven der Metaboliten wies auf eine geringe Tendenz hin: So erreichten die homozygoten Träger des Wildtyp-Allels im Schnitt kleinere maximale Plasmakonzentrationen und AUCs als die homozygoten Träger der Mutation. Doch auch hier war eine sehr hohe interindividuelle Variabilität zu beobachten, was anhand der großen Standardabweichungen deutlich wurde.

Tab. 2.14: Pharmakokinetische modellunabhängige Parameter von CPT-11, SN-38 und SN-38-G (MW ± Stabw. und 95% Konfidenzintervalle der Differenzen) in Abhängigkeit vom Genotyp des SNP C3435T nach Applikation von 180 mg/m² Irinotecan.

Parameter	SNP 3435 C>T			95% KI _{Diff}		
	CC [†] [n=3]	CT [†] [n=5]	TT [†] [n=6]	CC vs. CT	CC vs. TT	CT vs. TT
CPT-11-Pharmakokinetik						
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	13315.6 ± 2627.4	15294.2 ± 5268.0	14581.0 ± 2947.6	[10139.1; -5732.5]	[6057.9; -4792.5]	[5231.9; -6658.2]
AUC _{0-∞ Dosis} [h*ng/ml]*	74.9 ± 14.6	85.8 ± 29.5	82.1 ± 16.6	[56.5; -332.2]	[34.1; -26.9]	[29.6; -37.0]
t _{1/2} [h]	7.8 ± 0.3	7.3 ± 1.1	8.0 ± 0.6	[1.1; -2.1]	[1.1; -0.9]	[2.0; -0.5]
C _{max} [ng/ml]	1757.8 ± 147.7	1606.3 ± 300.1	1845.5 ± 337.8	[312.7; -590.2]	[584.0; -496.4]	[700.7; -222.3]
CL _{0-48 h} [l/h/m ²]	13.7 ± 2.5	12.6 ± 3.7	12.7 ± 3.0	[4.9; -6.7]	[3.8; -4.8]	[4.8; -4.7]
V _{Z 0-48 h} [l/m ²]	153.7 ± 29.0	131.7 ± 37.1	145.0 ± 29.8	[40.0; -80.5]	[40.9; -49.5]	[61.0; -34.4]
MRT _{0-48 h} [h]	6.5 ± 0.8	6.4 ± 0.9	6.5 ± 0.7	[1.4; -1.6]	[1.2; -1.3]	[1.2; -1.1]
SN-38-Pharmakokinetik						
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	156.1 ± 100.4	219.4 ± 63.7	241.4 ± 98.2	[202.6; -76.0]	[250.9; -80.3]	[137.8; -93.8]
t _{1/2} [h]	14.5 ± 4.0	13.7 ± 2.7	14.4 ± 2.7	[5.0; -6.6]	[5.1; -5.5]	[4.4; -3.1]
C _{max} [ng/ml]	10.9 ± 6.6	16.0 ± 6.9	18.0 ± 6.8	[17.3; -7.0]	[18.5; -4.2]	[11.4; -7.4]
MRT _{0-48 h} [h]	12.5 ± 0.9	13.3 ± 2.1	12.4 ± 1.6	[4.0; -2.4]	[2.3; -2.6]	[1.6; -3.5]
SN-38-G-Pharmakokinetik						
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	451.2 ± 334.5	528.2 ± 280.7	587.2 ± 210.7	[313.9; -519.9]	[559.0; -286.9]	[498.7; -20.6]
t _{1/2} [h]	15.2 ± 5.2	14.6 ± 6.1	15.9 ± 1.5	[9.7; -10.9]	[5.7; -4.4]	[7.0; -4.5]
C _{max} [ng/ml]	21.7 ± 15.1	29.1 ± 15.2	28.6 ± 8.5	[34.6; -19.8]	[24.9; -11.3]	[15.8; -16.9]
MRT _{0-48 h} [h]	13.7 ± 2.2	13.6 ± 3.4	14.1 ± 1.4	[5.3; -5.6]	[3.1; -2.4]	[3.9; -2.8]

*Alle 20 Patienten sind in die Untersuchung eingegangen; [†]CC = Wildtyp, CT = heterozygote Mutation, TT = Mutation.

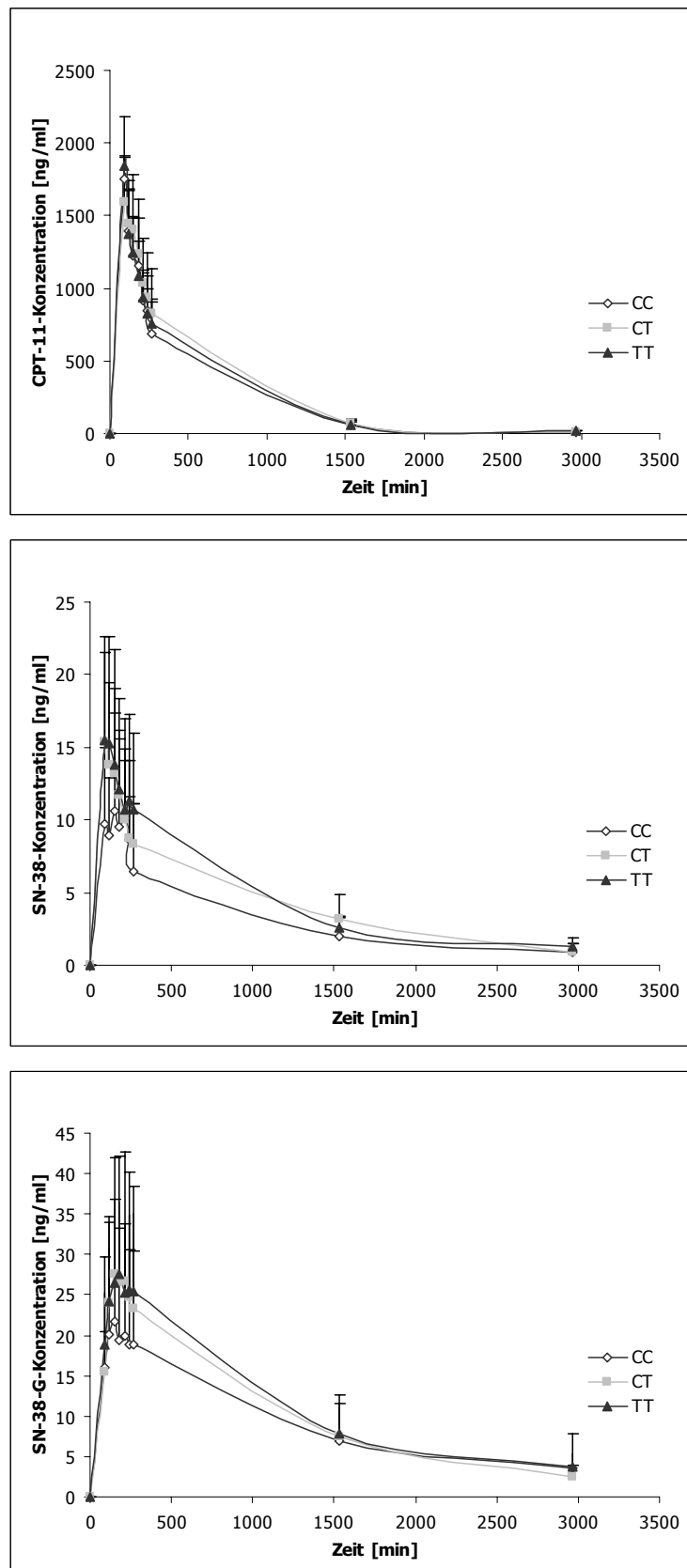


Abb. 2.23: Mittlere Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven von CPT-11, SN-38 und SN-38-G in Abhängigkeit vom Genotyp des SNPs C3435T (CC = Wildtyp, CT = heterozygote Mutation, TT = Mutation).

2.3.5.3 Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps A388G

Bezüglich der pharmakokinetischen Daten (Tab. 2.15) von Irinotecan konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen des SNPs A388G gefunden werden.

Im Hinblick auf die pharmakokinetischen Parameter des SN-38 ergab sich allerdings ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die maximalen Plasmakonzentrationen der homozygoten Träger des Wildtyp-Allels und den heterozygoten Trägern der Mutation ($p = 0.05$). Im speziellen wurde ein Trend einer ansteigenden AUC vom heterozygoten Träger der Mutation zum homozygoten Träger des Wildtyps festgestellt, der auch aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen (Abb. 2.24) ersichtlich wurde.

Beim statistischen Vergleich der pharmakokinetischen Parameter aller Individuen für den glucuronidierten Metaboliten SN-38-G konnten zwei signifikante Unterschiede bezüglich der Halbwertszeit und der maximalen Plasmakonzentration festgestellt werden. Die homozygoten Träger der Mutation zeigten dabei geringere Halbwertszeiten als die Träger des Wildtyps, während die heterozygoten Träger der Mutation geringere Plasmakonzentrationen als die Träger des Wildtyps und die homozygoten Träger der Mutation zeigten. Hinsichtlich der AUC konnte lediglich ein Trend ausgemacht werden, bei dem die Träger des Wildtyps und der homozygoten Mutation höhere AUC-Werte als die Träger der heterozygoten Genotypen aufwiesen.

Tab. 2.15: Pharmakokinetische modellunabhängige Parameter von CPT-11, SN-38 und SN-38-G (MW ± Stabw. und 95% Konfidenzintervalle der Differenzen) in Abhängigkeit vom Genotyp des SNP A388G nach Applikation von 180 mg/m² Irinotecan.

Parameter	SNP 388 A>G			95% KI _{Diff}		
	AA [†] [n=4]	AG [†] [n=6]	GG [†] [n=4]	AA vs. AG	AA vs. GG	AG vs. GG
CPT-11-Pharmakokinetik						
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	14203.4 ± 1929.9	13494.8 ± 2747.1	16530.3 ± 5883.5	[2962.1; -4379.3]	[9912.1; -7585.1]	[9308.3; -3237.2]
AUC _{0-∞ Dosis} [h*ng/ml]*	80.1 ± 10.8	75.9 ± 15.6	92.6 ± 32.9	[16.6; -25.0]	[54.9; -42.4]	[51.9; -18.5]
t _{1/2} [h]	8.1 ± 0.7	7.8 ± 0.8	7.1 ± 0.8	[0.7; -1.5]	[0.2; -1.2]	[0.5; -1.8]
C _{max} [ng/ml]	1783.9 ± 296.1	1724.0 ± 291.7	1724.4 ± 379.9	[375.6; -495.4]	[530.5; -590.0]	[488.8; -488.0]
CL _{0-48 h} [l/h/m ²]	12.7 ± 1.7	13.7 ± 3.0	11.9 ± 4.2	[4.8; -2.8]	[4.8; -5.6]	[3.4; -7.0]
V _{Z 0-48 h} [l/m ²]	148.8 ± 22.7	151.3 ± 26.4	121.8 ± 41.9	[39.8; -34.7]	[31.4; -58.3]	[19.8; -78.8]
MRT _{0-48 h} [h]	6.8 ± 0.9	6.5 ± 0.7	6.1 ± 0.6	[0.8; -1.5]	[0.6; -1.4]	[0.6; -1.4]
SN-38-Pharmakokinetik						
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	263.5 ± 105.8	188.3 ± 88.5	207.5 ± 65.0	[67.1; -217.3]	[130.3; -242.2]	[139.2; -100.8]
t _{1/2} [h]	14.0 ± 2.4	14.2 ± 3.5	14.3 ± 2.8	[4.9; -4.4]	[5.8; -5.2]	[4.9; -4.7]
C _{max} [ng/ml]	20.2 ± 0.9	11.5 ± 5.6	17.7 ± 7.1	[-0.2; -17.2]#	[11.3; -16.4]	[15.4; -3.1]
MRT _{0-48 h} [h]	12.3 ± 1.5	13.6 ± 1.4	11.9 ± 1.9	[3.5; -0.8]	[3.2; -4.0]	[0.6; -4.1]
SN-38-G-Pharmakokinetik						
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	658.8 ± 198.1	399.6 ± 188.0	621.5 ± 317.7	[26.8; -545.3]	[421.3; -495.9]	[587.0; -143.1]
t _{1/2} [h]	17.6 ± 1.7	15.2 ± 5.5	13.1 ± 2.3	[4.2; -9.1]	[-1.0; -8.0]#	[4.7; -8.9]
C _{max} [ng/ml]	31.3 ± 7.5	19.0 ± 6.6	35.8 ± 15.4	[-1.8; -22.6]#	[25.5; -16.4]	[32.9; 0.7]#
MRT _{0-48 h} [h]	15.1 ± 0.6	13.9 ± 3.1	12.5 ± 1.0	[2.5; -4.8]	[-1.1; -4.1]#	[2.3; -5.2]

*Alle 20 Patienten sind in die Untersuchung eingegangen; [†]AA = Wildtyp, AG = heterozygote Mutation, GG = Mutation, #statistisch signifikant (p < 0.05).

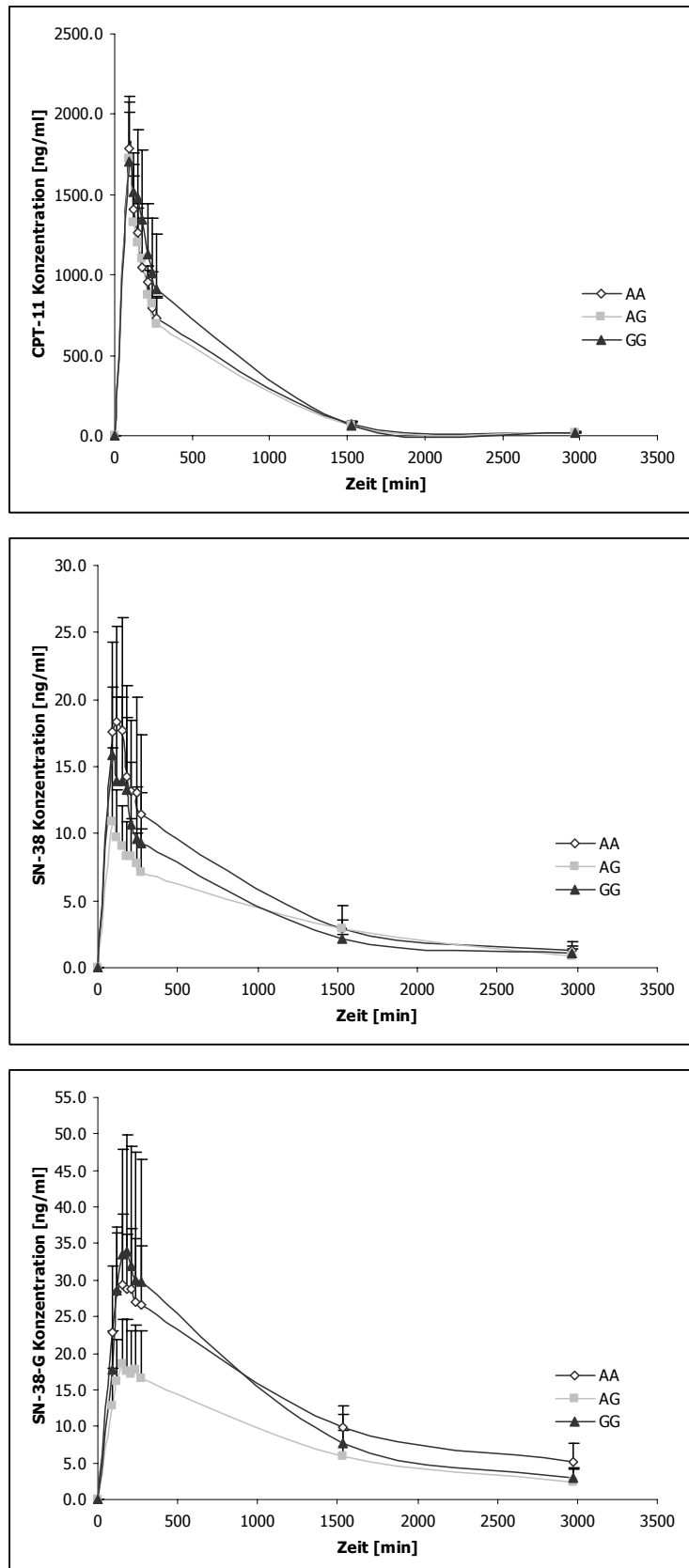


Abb. 2.24: Mittlere Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven von CPT-11, SN-38 und SN-38-G in Abhängigkeit vom Genotyp des SNPs A388G (AA = Wildtyp, AG = heterozygote Mutation, GG = homozygote Mutation).

2.3.5.4 Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps OATP-C*15

Innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs konnten 6 Patienten ausgemacht werden, welche die Doppelmutation OATP-C*15 trugen. Die pharmakokinetischen Parameter in Abhängigkeit vom untersuchten Genotyp sind in Tabelle 2.16 dargestellt, während die Konzentrations-Zeit-Kurven in Abbildung 2.25 veranschaulicht sind.

Keine statistisch signifikanten Unterschiede konnten für die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen der genetischen Variante des OATP-C*15-Polymorphismus und den ermittelten pharmakokinetischen Parametern für die Analyten CPT-11, SN-38 und SN-38-G festgestellt werden.

Aus den pharmakokinetischen Parametern konnte lediglich ein schwacher Trend abgelesen werden. So zeigten die Träger der Mutation etwas höhere AUC-Werte für Irinotecan, SN-38 und SN-38-G als die Träger des Wildtyp-Allels. Dazu stimmig konnte eine leicht erniedrigte Irinotecan-Clearance für die Träger der Mutation festgestellt werden.

Aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen geht für beide Metaboliten eine hohe interindividuelle Variabilität hervor, die durch die großen Standardabweichungen charakterisiert wird.

Tab. 2.16: Pharmakokinetische modellunabhängige Parameter von CPT-11, SN-38 und SN-38-G (MW ± Stabw. und 95% Konfidenzintervalle der Differenzen) in Abhängigkeit vom beobachteten Genotyp der Doppelmutation OATP-C*15 nach Applikation von 180 mg/m² Irinotecan.

Parameter	OATP-C*1a/*1b [†] Wildtyp [n=8]	OATP-C*15 Mutation [n=6]	95% KI _{Diff}
CPT-11-Pharmakokinetik			
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	13662.2 ± 2468.9	15767.7 ± 4852.5	[6350.6; -2139.7]
AUC _{0-∞ Dosis} [h*ng/ml]*	75.0 ± 22.1	86.7 ± 25.3	[38.9; -15.5]
t _{1/2} [h]	7.9 ± 0.5	7.4 ± 1.0	[0.4; -1.4]
C _{max} [ng/ml]	1788.1 ± 286.0	1678.7 ± 321.8	[240.6; -459.4]
CL _{0-48 h} [l/h/m ²]	13.4 ± 2.6	12.2 ± 3.5	[2.2; -4.8]
V _{Z 0-48 h} [l/m ²]	152.3 ± 26.4	128.6 ± 34.1	[11.0; -58.4]
MRT _{0-48 h} [h]	6.5 ± 0.8	6.3 ± 0.8	[0.7; -1.1]
SN-38-Pharmakokinetik			
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	209.9 ± 108.4	222.5 ± 57.5	[117.9; -92.7]
t _{1/2} [h]	14.7 ± 3.0	13.5 ± 2.6	[2.8; -5.3]
C _{max} [ng/ml]	15.6 ± 7.8	16.0 ± 6.2	[10.8; -9.9]
MRT _{0-48 h} [h]	12.7 ± 1.2	12.9 ± 2.2	[2.5; -2.1]
SN-38-G-Pharmakokinetik			
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	515.4 ± 248.5	565.9 ± 267.4	[348.4; -247.4]
t _{1/2} [h]	15.7 ± 3.0	14.7 ± 5.4	[4.6; -6.7]
C _{max} [ng/ml]	24.7 ± 10.2	30.8 ± 14.2	[22.7; -10.5]
MRT _{0-48 h} [h]	14.1 ± 1.6	13.5 ± 3.0	[2.5; -3.7]

*Alle 20 Patienten sind in die Untersuchung eingegangen; [†]Träger des Genotyps OATP-C*1a oder OATP-C*1b.

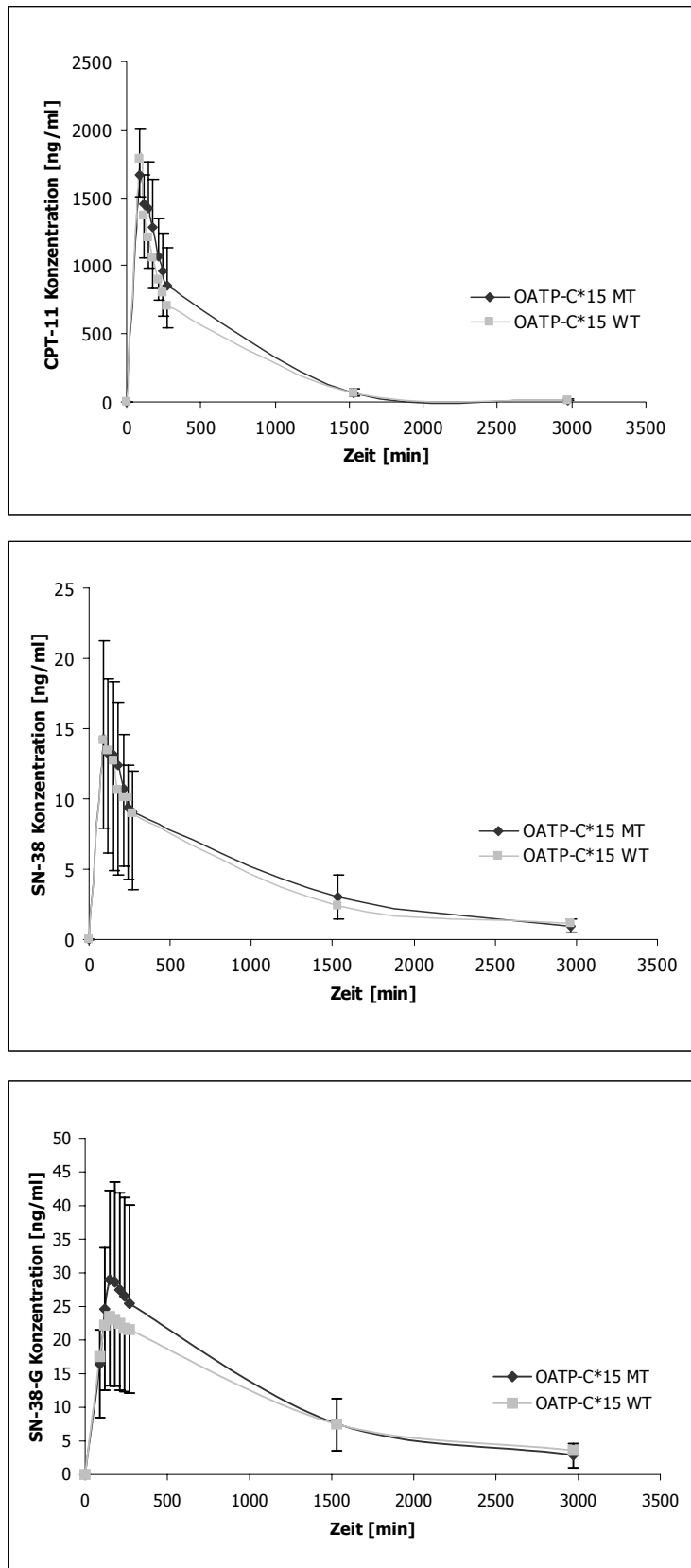


Abb. 2.25: Mittlere Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven von CPT-11, SN-38 und SN-38-G in Abhängigkeit vom Genotyp der Doppelmutation OATP-C*15 (WT = Wildtyp, MT = Mutation).

2.3.5.5 Pharmakokinetische Parameter als Funktion des Genotyps UGT1A1*28

Bezüglich der untersuchten pharmakokinetischen Parameter (Tab. 2.17) bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Individuen mit dem Genotyp 6/6 und den elf Individuen mit dem Genotyp 6/7. Dennoch lässt sich ein Trend aus den berechneten Parametern in Bezug auf die untersuchten Metaboliten erkennen. So zeigten die heterozygoten Träger der Mutation höhere AUC-Werte für SN-38 ($p = 0.09$) als die homozygoten Träger des Wildtyps. Für SN-38-G verhielt es sich genau andersherum. Hier zeigten die Träger der heterozygoten Mutation etwas geringere AUC-Werte.

Die Betrachtung der Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven (Abb. 2.27) untermauert diesen Trend für beide Metabolite.

Ein aussagekräftigeres Ergebnis in Bezug auf einen Zusammenhang der genetischen Variabilität des UGT1A1-Gens und der Irinotecan-Pharmakokinetik erhält man durch den Vergleich der AUC-Verhältnisse $AUC_{SN-38-G}/AUC_{SN-38}$ (REG-Werte, s. Kap. 2.3.4.4) der beiden untersuchten Genotypen.

Abbildung 2.26 zeigt, dass es einen statistisch signifikanten Unterschied angesichts der metabolischen Aktivität zwischen den beiden Genotypen gibt ($p = 0.01$). Die heterozygoten Träger der Mutation weisen eine schlechtere Metabolisierungsaktivität auf als die Träger des Wildtyps.

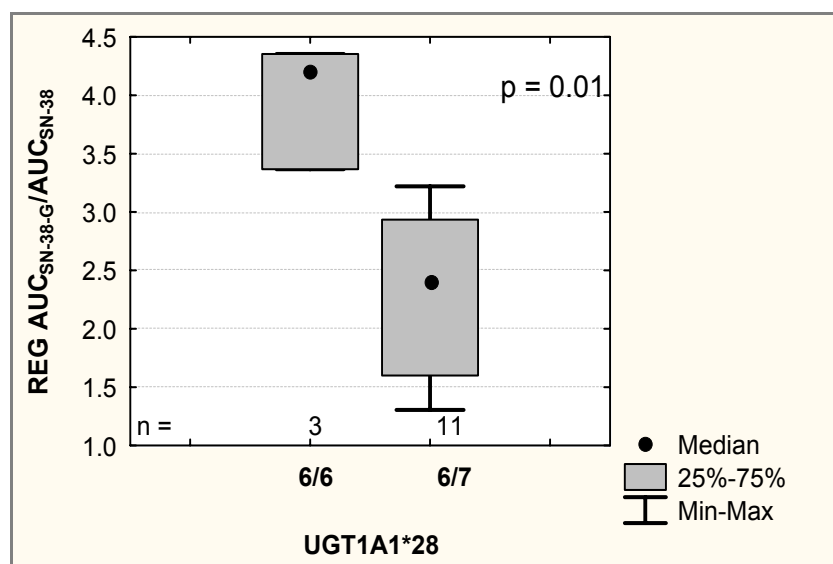


Abb. 2.26: Vergleich der zwei Genotypen des UGT1A1*28-Polymorphismus in Bezug auf die AUC-Verhältnisse (6/6 = Wildtyp; 6/7 = heterozygoter Träger der Mutation).

Tab. 2.17: Pharmakokinetische modellunabhängige Parameter von CPT-11, SN-38 und SN-38-G (MW ± Stabw. und 95% Konfidenzintervalle der Differenzen) in Abhängigkeit vom beobachteten Genotyp der Mutation UGT1A1*28 nach Applikation von 180 mg/m² Irinotecan.

Parameter	UGT1A1*28 6/6 Wildtyp [n=3]	UGT1A1*28 6/7 Mutation [n=11]	95% KI _{Diff}
CPT-11-Pharmakokinetik			
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	17552.8 + 5861.0	13749.6 + 2698.2	[1072.8; -8679.1]
AUC _{0-∞ Dosis} [h*ng/ml]*	80.6 + 29.4	78.5 + 21.4	[30.4; -34.6]
t _{1/2} [h]	7.4 + 1.0	7.8 + 0.8	[1.5; -0.8]
C _{max} [ng/ml]	2020.7 + 84.1	1665.0 + 286.2	[18.5; -729.8]
CL _{0-48 h} [l/h/m ²]	10.9 + 3.4	13.4 + 2.8	[6.6; -1.6]
V _{Z 0-48 h} [l/m ²]	119.3 + 50.6	148.4 + 23.4	[71.4; -13.1]
MRT _{0-48 h} [h]	6.2 + 0.2	6.5 + 0.8	[1.4; -0.7]
SN-38-Pharmakokinetik			
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	140.0 + 86.3	235.8 + 79.2	[210.0; -18.4]
t _{1/2} [h]	13.0 + 1.5	14.5 + 3.0	[5.5; -2.6]
C _{max} [ng/ml]	14.1 + 8.3	16.2 + 6.8	[12.2; -8.0]
MRT _{0-48 h} [h]	12.0 + 1.3	12.9 + 1.7	[3.3; -1.5]
SN-38-G-Pharmakokinetik			
AUC _{0-48 h} [h*ng/ml]	564.9 + 393.7	529.4 + 220.4	[330.2; -401.1]
t _{1/2} [h]	12.1 + 3.7	16.1 + 3.9	[9.5; -1.5]
C _{max} [ng/ml]	30.9 + 21.0	26.3 + 9.6	[12.8; -22.1]
MRT _{0-48 h} [h]	12.5 + 1.9	14.2 + 2.2	[4.8; -1.4]

*Alle 20 Patienten sind in die Untersuchung eingegangen.

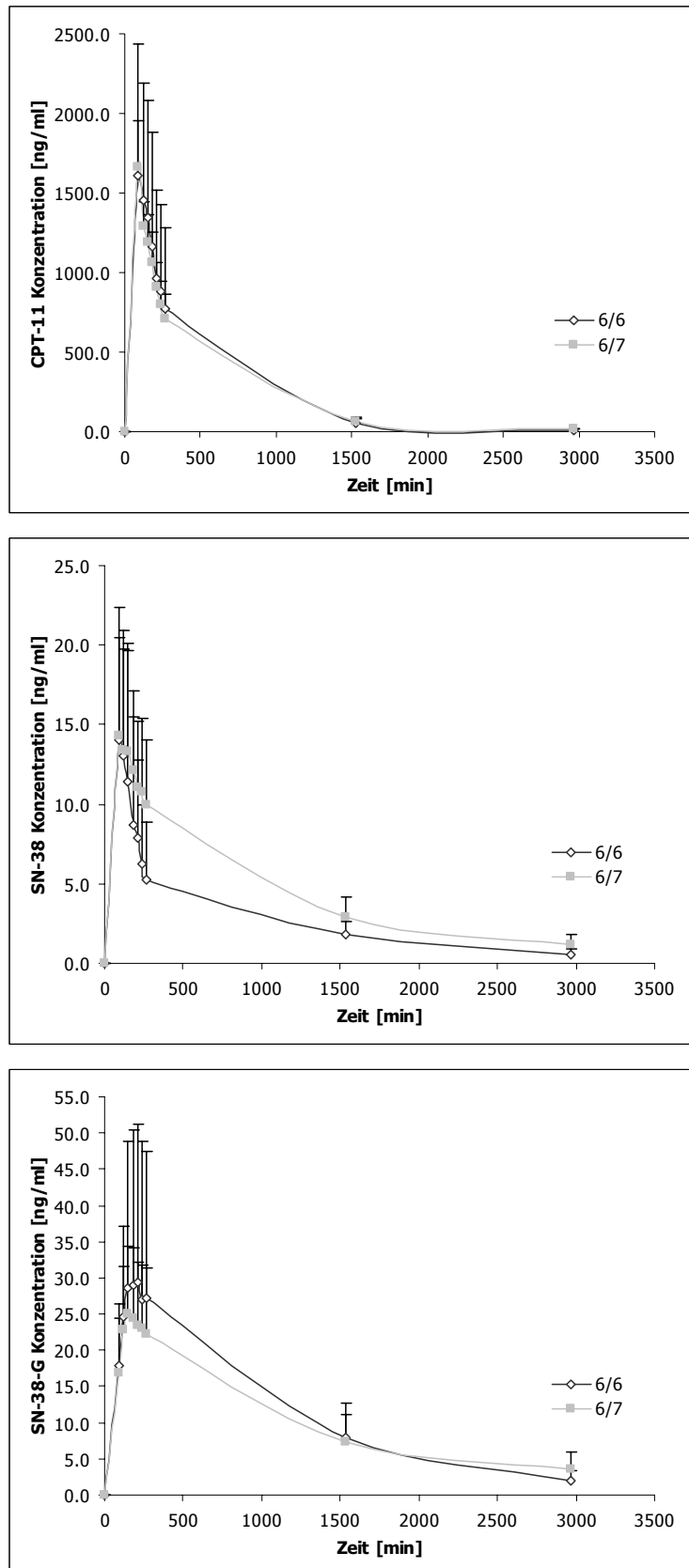


Abb. 2.27: Mittlere Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven von CPT-11, SN-38 und SN-38-G in Abhängigkeit vom Genotyp des Dinukleotid-Polymorphismus UGT1A1*28 (6/6 = Wildtyp, 6/7 = heterozygote Mutation).

2.3.6 Toxizität

Von allen untersuchten Patienten wurde die therapieassoziierte Toxizität gemäß der in Kapitel 2.2.5.3 beschriebenen Kriterien dokumentiert. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Hämato-, Hepato- und Nephrotoxizität gelegt.

Hämato-, nephro- und hepatotoxische Effekte wurden mit Hilfe der dokumentierten Laborparameter erfasst und anhand der Toxizitätskriterien des National Cancer Institute evaluiert (NCI, 1999; s. Kap. 5.1).

Zur Bewertung der irinotecaninduzierten Diarrhö, die durch Befragung der Patienten erfasst wurde, wurden ebenfalls die vom National Cancer Institute entwickelten Kriterien herangezogen.

In der folgenden Tabelle 2.18 sind die Häufigkeiten, mit der unerwünschte Wirkungen auftraten, zusammengefasst. An dieser Stelle sei angemerkt, dass keine einheitliche Auswertung der relevanten Laborparameter für jeden Patienten erfolgen konnte, da innerhalb der an der Studie beteiligten onkologischen Zentren unterschiedliche Laborparameter aufgezeichnet und zur Verfügung gestellt wurden. Von drei Patienten lagen keine aktuellen Laborparameter vor.

Tab. 2.18: Anzahl der Patienten mit unerwünschten Wirkungen nach Applikation von Irinotecan in unterschiedlichen Dosierungen.

Schweregrad	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Hämatotoxizität (n=17)*					
Hämoglobin	16	1	-	-	-
Leukozyten	10	6	1	-	-
Thrombozyten	16	1	-	-	-
Nephrotoxizität (n=14)*					
Kreatinin	10	3	1	-	-
Hepatotoxizität					
GOT (n=15)*	3	10	2	-	-
GPT (n=13)*	4	8	-	1	-
AP (n=12)*	10	1	1	-	-
Diarrhö (n=20)*	7	10	2	1	-

- = Toxizitätsgrad wurde nicht beobachtet.

*Anzahl der Patienten, für die auswertbare Daten vorlagen.

Die Patienten vertrugen die verabreichte Therapie im Allgemeinen sehr gut. Bei den auswertbaren Patienten kam es insgesamt nur zweimal zu unerwünschten Wirkungen des Schweregrades 3.

Hinsichtlich der Hämatotoxizität wurde in der Mehrheit der Fälle keine Toxizität beobachtet; eine leichte Hämatotoxizität trat lediglich bei 18% der Patienten auf.

Bezüglich der Nierenfunktion zeigten ungefähr ein Drittel der untersuchten Patienten eine leichte bis mittelmäßige Toxizität.

Hepatotoxische Effekte wurden im Vergleich zur Hämato- und Nephrotoxizität häufiger festgestellt. Bei insgesamt 58% der Patienten kommt es zu einer Erhöhung der für die Toxizität untersuchten Laborparameter. Toxizitäten der Grade 2 und 3 wurden bei 10% der Patienten erfasst. Ansonsten waren die unerwünschten Effekte, die am häufigsten Grad 1 aufwiesen, eher moderat ausgeprägt.

65% der in die Studie eingeschlossenen Patienten erlitten Diarrhöen, wobei diese in der Mehrzahl der Fälle bei Schweregrad 1 eingestuft werden konnten. 15% der Patienten zeigten eine Diarrhö des Grades 2 oder 3. Vergleicht man die Patientengruppe, der Irinotecan in einer Dosierung von 180 mg/m² appliziert wurde, mit der Patientengruppe, der Irinotecan in einer Dosierung von 50-135 mg/m² verabreicht wurde, so fällt auf, dass 71% der Patienten mit der höheren Dosierung unter einer Diarrhö litten und dass die höheren Toxizitätsgrade ebenfalls in dieser Gruppe zu finden waren.

Beim Vergleich dieser zwei Patientengruppen in Bezug auf die Häufigkeit des Auftretens toxischer Effekte wird deutlich, dass unter den Patienten mit der höheren Irinotecan-Dosierung häufiger unerwünschte Wirkungen auftraten. So konnten insgesamt 76% der beobachteten Toxizitäten bei der Patientengruppe mit der höheren Irinotecan-Dosierung beobachtet werden.

2.3.7 Zusammenhänge von pharmakokinetischen Parametern mit klinischen Effekten

Die erhaltenen pharmakokinetischen Parameter wurden mit den klinischen Effekten korreliert. Bei den klinischen Effekten wurde insbesondere die Toxizität (Hämato-, Nephro-, Hepato- und Neurotoxizität) untersucht. Da der Metabolit SN-38 ca. 100 - 1000 mal stärker zytotoxisch ist als das Prodrug Irinotecan (Kawato *et al.*, 1991) und in Verdacht steht für das Auftreten der verzögerten Diarrhöen

verantwortlich zu sein (Hecht, 1998), wurde bei den pharmakokinetischen Parametern der C_{\max} -Wert und die AUC dieses Metaboliten analysiert.

Für die Evaluierung wurden die Patienten gemäß den unerwünschten Wirkungen in zwei Gruppen aufgeteilt:

Gruppe 1: Patienten mit keinen unerwünschten Wirkungen (Toxizitätsgrad 0)

Gruppe 2: Patienten mit unerwünschten Wirkungen (Toxizitätsgrade 1 - 3)

Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten und zur Vermeidung von Fehlern wurden nur Patienten mit der höheren Irinotecan-Dosierung (180 mg/m^2) in die Untersuchung aufgenommen. Insgesamt konnten 14 Patienten für die Auswertung berücksichtigt werden.

Anschließend wurde ein Vergleich der pharmakokinetischen Parameter zwischen den Gruppen vorgenommen und mögliche Unterschiede mit Hilfe des *U-Tests nach Mann und Whitney* auf ihre statistische Signifikanz geprüft.

Für die Hämatotoxizität hinsichtlich der Hämoglobin- und Thrombozytenkonzentration konnte keine Auswertung vorgenommen werden, da jeweils nur ein Patient eine leichte Toxizität zeigte.

Eine Verringerung der Leukozytenzahl (Toxizitätsgrad 1 - 2) konnte bei drei Patienten festgestellt werden. Bei diesen Patienten wurde mit 250.1 h*ng/ml eine etwas höhere mediane AUC_{Dosis} gemessen, als bei den Patienten ohne Leukopenie, bei denen die mediane AUC 244.2 h*ng/ml betrug. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0.41$). Exemplarisch wird die AUC für die beiden klinischen Patientengruppen in Abbildung 2.28 dargestellt.

Die Gruppe der Patienten mit Leukopenie zeigte außerdem einen deutlich höheren medianen C_{\max} -Wert (23.9 ng/ml) als die Gruppe ohne Leukopenie (14.3 ng/ml). Dieser Unterschied war jedoch mit $p = 0.07$ statistisch nicht signifikant.

In insgesamt vier Fällen wurde eine leichte Nephrotoxizität festgestellt. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der AUC und der C_{\max} -Werte ($p = 0.34$, $p = 0.26$).

In Bezug auf die Hepatotoxizität, die anhand der GOT-, GPT- und AP-Konzentrationen bewertet wurde, konnte keine allgemeine Aussage getroffen werden, da jeder Patient erhöhte GOT-Werte zeigte. Beim Vergleich der Patienten, die erhöhte GPT- oder AP-Werte zeigten mit denen, die normwertige

Konzentrationen aufwiesen, konnte kein Unterschied in Bezug auf die untersuchten Parameter AUC und C_{\max} festgestellt werden.

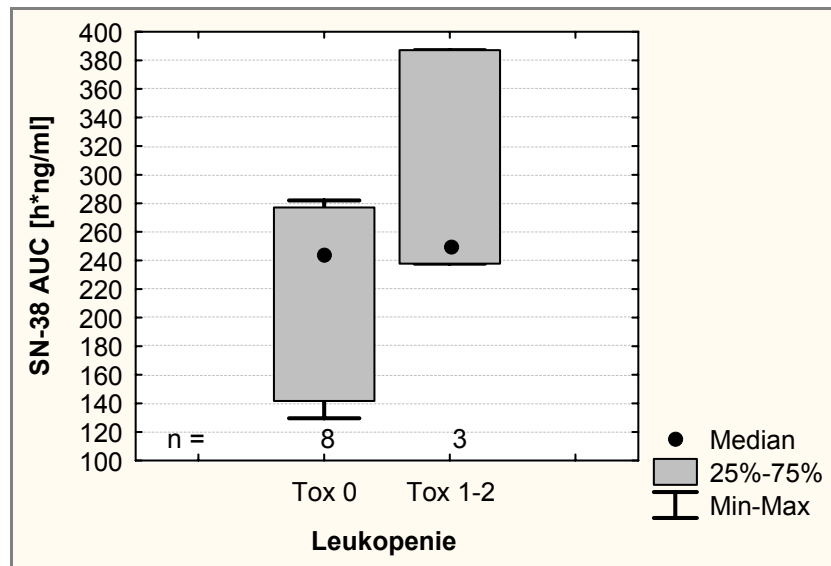


Abb. 2.28: Beziehung zwischen der AUC von SN-38 und der auftretenden Leukopenie.

71% der Patienten erlitten eine Diarrhö, wobei die des Schweregrades 1 am häufigsten vorkam. Patienten, die keine verzögerten Durchfälle bekamen, hatten eine mediane AUC von 139.2 h*ng/ml während bei Patienten, die einen Toxizitätsgrad von 1 - 3 aufwiesen, die mediane AUC_{Dosis} einen Wert von 244 h*ng/ml erreichte. In diesem Fall liegt der p-Wert für den Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei $p = 0.26$ (Abb. 2.29).

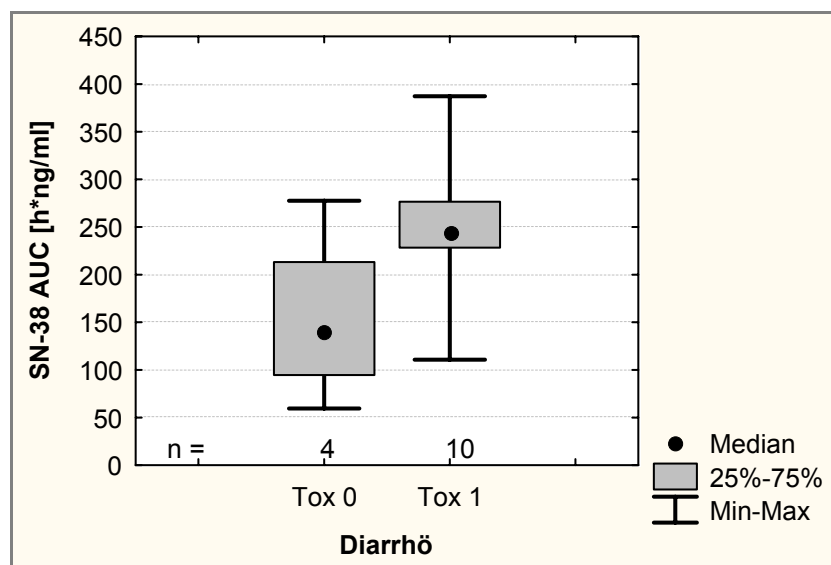


Abb. 2.29: Beziehung zwischen der AUC von SN-38 und der auftretenden Diarrhö.

Da SN-38 im Verlaufe des Metabolismus zu SN-38-Glucuronid verstoffwechselt und damit detoxifiziert wird, ist das jeweilige AUC-Verhältnis $AUC_{SN-38-G}/AUC_{SN-38}$ (REG-Wert, s. Kap. 2.3.4.4) der beiden Gruppen relevant. Beim Vergleich der beiden Gruppen Tox 0 und Tox 1 (Abb. 2.30), gab es keinen Unterschied der AUC-Verhältnisse ($p = 0.89$). Beide Gruppen wiesen ähnliche Glucuronidierungskapazitäten auf.

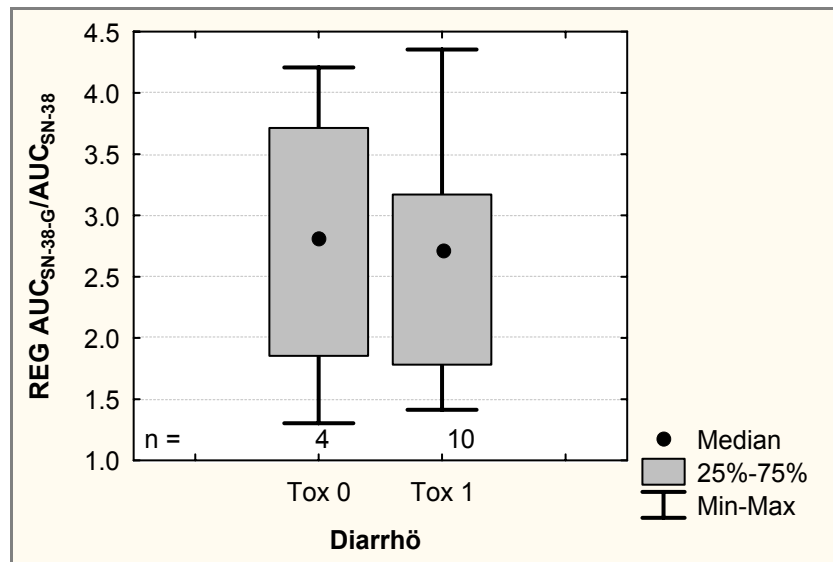


Abb. 2.30: Beziehung zwischen dem Verhältnis $AUC_{SN-38-G}/AUC_{SN-38}$ und der auftretenden Diarrhö.

2.3.8 Zusammenhänge von pharmakogenetischen Parametern mit klinischen Effekten

Genauso wie die pharmakokinetischen Parameter können die pharmakogenetischen Parameter mit den auftretenden Toxizitäten korreliert werden (Tab. 2.19). In diesem Sinne bot es sich an, die Schweregrade 2 und 3 der Diarrhö mit den Genotypen des jeweiligen SNPs zu korrelieren.

Insgesamt sind drei Fälle von schwerwiegenderen Durchfällen aufgetreten. Auffällig war, dass die drei betroffenen Patienten bei jedem der untersuchten SNPs eine heterozygote oder sogar homozygote Mutation (bis auf eine Ausnahme) aufwiesen. Insbesondere die Doppelmutation OATP-C*15 trat bei allen drei Fällen auf.

Tab. 2.19: Assoziation der auftretenden Diarrhöen mit den Genotypen der jeweiligen Polymorphismen.

	Diarrhö (Schweregrad 2-3)	
	aufgetreten (n=3)	nicht aufgetreten (n=17)
<i>C1236T</i>		
CC	0	3
CT	2	9
TT	1	5
<i>C3435T</i>		
CC	0	3
CT	2	9
TT	1	5
<i>A388G</i>		
AA	0	7
AG	0	7
GG	3	3
<i>OATP-C*15</i>		
Mutation	3	4
Wildtyp	0	13
<i>UGT1A1*28</i>		
6/6	1	5
6/7	2	12

2.3.9 Individuelle Einflussfaktoren auf die Irinotecan-Pharmakokinetik

Die interindividuelle Variabilität der pharmakokinetischen Parameter ist nicht zufallsbedingt, sondern hat physiologische oder andere Gründe. Alter, Geschlecht, Körpergröße und Gewicht können Einfluss auf Verteilung, Metabolismus und Elimination haben (Derendorf *et al.*, 2002). Aus diesen Gründen wurden die dokumentierten Patientencharakteristika mit der Pharmakokinetik des Irinotecans und seiner beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G korreliert (Tab. 2.20). Für die nicht-normalverteilten Variablen wurde die Rangkorrelation nach Spearman angewandt; als Ergebnis sind die ermittelten Korrelationskoeffizienten (r) angegeben.

Innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs, welches 180 mg/m² Irinotecan appliziert bekommen hat, zeigte sich jedoch nur ein statistisch signifikanter

Zusammenhang der AUC des aktiven Metaboliten SN-38 mit dem Alter ($r = 0.57$, $p < 0.05$).

Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden weder für Irinotecan noch für die beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G gefunden. Im Durchschnitt war die mittlere Gesamtkörperclearance bei den Frauen mit 12.3 l/h/m^2 etwas niedriger als bei den Männern mit 13.1 l/h/m^2 .

Tab. 2.20: Einfluss der Patientencharakteristika auf die Pharmakokinetik.

Parameter	Alter (r)*	Gewicht (r)*	KOF (r)*	Größe (r)*	BMI (r)*
<i>Irinotecan-Pharmakokinetik</i>					
$t_{1/2}$	0.311	-0.115	-0.217	-0.128	-0.022
C_{\max}	-0.088	-0.077	-0.170	-0.132	-0.015
$AUC_{0\text{-last}}$	0.172	0.147	-0.053	-0.040	0.248
$CL_{0\text{-last}}$	-0.201	-0.143	0.073	0.070	-0.262
$Vz_{0\text{-last}}$	-0.159	-0.273	-0.143	-0.097	-0.317
<i>SN-38-Pharmakokinetik</i>					
$t_{1/2}$	0.232	-0.385	-0.360	-0.392	-0.265
C_{\max}	0.283	-0.218	-0.326	-0.370	-0.121
$AUC_{0\text{-tlast}}$	0.567‡	-0.112	-0.139	-0.207	-0.042
<i>SN-38-G-Pharmakokinetik</i>					
$t_{1/2}$	0.514	-0.114	-0.234	-0.326	0.024
C_{\max}	-0.032	-0.480	-0.497	-0.288	-0.431
$AUC_{0\text{-last}}$	0.395	-0.200	-0.225	-0.095	-0.200
<i>Metabolisierungsquotienten</i>					
REC	0.351	0.029	0.044	-0.046	-0.007
REG	-0.247	-0.042	-0.002	0.218	-0.152

*(r): Korrelationskoeffizienten nach Spearmans Rangkorrelation; ‡statistisch signifikanter Zusammenhang ($p < 0.05$).

2.4 Diskussion der Ergebnisse

2.4.1 Bioanalytische Quantifizierungsmethode für Irinotecan und seine Metaboliten im Plasma

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Irinotecan, SN-38 und SN-38-G im Plasma quantifiziert werden. Für die Probenaufarbeitung und die sich anschließende HPLC-Methode wurde ein bereits literaturbekanntes Verfahren von Poujol *et al.* (2003) modifiziert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit adaptierte Methode wurde gemäß den internationalen Anforderungen für Bioanalytik validiert. Im Folgenden wird die durchgeführte Methode mit der Original-Methode von Poujol *et al.* (2003) hinsichtlich der Probenaufarbeitung, der HPLC-Methode und der validierten Parameter verglichen.

In ihrer Probenaufarbeitung unterscheiden sich beide Methoden nur gering voneinander. Während Poujol *et al.* (2003) zur Fällung der Plasmaproteine lediglich ein Gemisch aus Acetonitril und Methanol verwendeten, wurde für die vorliegende Arbeit ein zusätzlicher Säurezusatz gewählt, um die Proteinfällung effektiver zu gestalten. Eine weitere Modifikation besteht in einem zusätzlichen Einfrierschritt. Da das gefällte Protein nach dem Einfrieren besser abgetrennt werden konnte, wurde die Langlebigkeit der HPLC-Säule dadurch merklich erhöht.

Um den Fließmittelbedarf zu reduzieren, wurde bei der Durchführung der HPLC-Methode im Rahmen dieser Arbeit eine HPLC-Säule mit geringerem Säulendurchmesser im Vergleich zu der Original-Methode ausgewählt. Zum Schutz dieser Säule vor Phosphatpuffer-Kristallen und nicht-gefällten Proteinbestandteilen, wurde ein zusätzliches Säulenspülprogramm eingeführt. Dadurch blieb die Säule länger leistungsfähig und der Säulendruck stieg weniger rasch an. Poujol *et al.* (2003) verwendeten zur Elution der Analyten einen Fließmittel-Gradienten, der für diese Arbeit nicht übernommen wurde, da sich die Retentionszeiten auch ohne diesen nicht merklich änderten und eine Trennung auch so sehr selektiv war. Die hier verglichenen HPLC-Methoden benutzten unterschiedliche Wellenlängen zur Detektion. Poujol *et al.* (2003) detektierten Irinotecan und SN-38-G mit einer Extinktions- und Emissionswellenlänge von 370 und 470 nm und SN-38 mit 370 und 534 nm, während die Wellenlängen in dieser Arbeit bei 485 und 542 nm für Irinotecan und SN-38-G und bei 359 und 536 nm für SN-38 lagen. Durch die Änderung der Wellenlängen konnte die Empfindlichkeit der HPLC in dieser Arbeit erhöht werden. Die Verwendung eines Detektorprogramms war unumgänglich, da

SN-38 bei der Wellenlänge zur Detektion von Irinotecan und SN-38-G nicht zu detektieren war, bzw. eine sehr schlechte Nachweisempfindlichkeit besaß.

Für die im Rahmen dieser Arbeit modifizierte Methode wurden ähnliche Validierungsparameter erhalten, wie die von Poujol *et al.* (2003) ermittelten. Die Bestimmungsgrenzen für Irinotecan und SN-38 lagen in dieser Arbeit bei 2.5 und 0.5 ng/ml, bei Poujol *et al.* (2003) wurden sie bei jeweils 0.5 ng/ml detektiert. Die Nachweisgrenze für Irinotecan war mit 2.5 ng/ml in dieser Arbeit ausreichend, da Konzentrationen deutlich über 2.5 ng/ml erhalten wurden. Die geforderte Linearität konnte über den gesamten Messbereich nachgewiesen werden, die Korrelationskoeffizienten lagen über $r = 0.999$. Die berechneten Wiederfindungsraten für Irinotecan und SN-38 lagen in der Studie von Poujol *et al.* (2003) im Mittel bei 96 und 97%. In der hier vorliegenden Arbeit wurden sie mit 107% und 105% bestimmt. Eine mögliche Erklärung für die hohen Wiederfindungsraten besteht darin, dass ein Teil der Analyten bei der Aufarbeitung der wässrigen Proben an den Probengefäßen adsorbieren und somit zu falsch niedrigen Signalflächen führen. Zusätzlich kommt es gegebenenfalls bei Aufarbeitung der matrixhaltigen Proben durch das Abzentrifugieren des hohen Proteinanteils zu einer Aufkonzentration der Analyten. Um der leicht erhöhten Wiederfindungsrate Rechnung zu tragen wurde für die Berechnung der Patientenproben die Regressionsgerade der matrixadaptierten Kalibrierung zugrunde gelegt.

Die Ergebnisse für die *Intraday*- und *Interday*-Richtigkeit und Präzision sind in beiden Studien gut miteinander vergleichbar. In den untersuchten Messbereichen lagen die ermittelten Werte immer im geforderten Bereich, das heißt unter 15% und unter 20% im Bereich der Bestimmungsgrenze.

Zur Quantifizierung des glucuronidierten Metaboliten SN-38-G wurde eine indirekte Methode aufgrund des fehlenden Standards eingesetzt. Daher konnte für den glucuronidierten Analyten keine direkte Methodvalidierung (vgl. Poujol *et al.*, 2003) durchgeführt werden. Die Quantifizierung wurde stattdessen über den Zuwachs der SN-38-Signalfläche nach Zugabe von β -Glucuronidase zur Plasmaprobe durchgeführt. Durch Vergleich dieser Signalfläche mit derjenigen, die ohne Zugabe von β -Glucuronidase bestimmt wurde, wurde die Konzentration an SN-38-G möglichst genau ermittelt. Daher wurden die SN-38-G-Konzentrationen stets vierfach bestimmt. Die Standardabweichungen für die so bestimmten Konzentrationen lagen jederzeit unter 5%. Insgesamt kann angenommen werden, dass die Quantifizierung von SN-38-G indirekt über die Validierung von SN-38 abgesichert ist.

Abschließend kann festgestellt werden, dass sich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit adaptierte Methode sehr gut für die Quantifizierung der drei Analyten

Irinotecan, SN-38 und SN-38-G eignete. Die Anforderungen an bioanalytische Verfahren wurden damit voll erfüllt.

2.4.2 Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakogenetik des Irinotecans

Bedingt durch den sehr komplexen Metabolismus zeigt Irinotecan eine sehr hohe interindividuelle Variabilität seiner Pharmakokinetik und Pharmakodynamik. Viele Versuche wurden in den letzten Jahren unternommen, das komplexe pharmakokinetische Profil von Irinotecan aufzuklären und zu verstehen. Bisher profitierten die Ergebnisse dieser Untersuchungen jedoch nicht in einer besseren Vorhersage der Häufigkeit und Schwere der auftretenden Nebenwirkungen.

Schon sehr früh wurde beschrieben, dass kein Zusammenhang zwischen der Körperoberfläche und der Pharmakokinetik des Irinotecans besteht, so dass die hohe interindividuelle Variabilität mit dieser Strategie nicht verringert werden konnte.

Neue Ansätze zur Individualisierung der Irinotecan-Therapie wurden in der Pharmakogenetik gefunden. Am Metabolismus und am Transport des Irinotecans sind viele Enzyme und Arzneimitteltransporter beteiligt (Mathijssen *et al.*, 2003). Variationen in den Genen dieser Enzyme oder Transporter können somit für die hohe Variabilität verantwortlich sein (de Jong *et al.*, 2006). Die meisten Variationen treten als sogenannte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) auf (Collins *et al.*, 1998). In den codierenden Regionen eines Gens können sie zu einer veränderten Expression und/oder Funktion des jeweiligen Enzyms oder Transporters führen, wodurch es zu Änderungen in den Konzentrationen von Arzneistoffen und deren Metaboliten kommen kann (Efferth *et al.*, 2005).

2.4.2.1 Individuelle Pharmakokinetik von Irinotecan

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurde die Pharmakokinetik von Irinotecan und seinen beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G nach Gabe unterschiedlicher irinotecanhaltiger Therapieschemata untersucht. Die hier ermittelten pharmakokinetischen Parameter werden im Folgenden mit den in der Literatur veröffentlichten Werten für die maximal erreichten Plasmakonzentrationen (C_{max}), die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC), die Clearance (CL), das Verteilungsvolumen (V_z) und die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) verglichen.

Beim Vergleich der Ergebnisse ist zu beachten, dass sich die Methodik der verschiedenen Studien stark auf die ermittelten pharmakokinetischen Parameter auswirken kann: Neben der angewandten Bestimmungsmethode und der

Bestimmungsgrenze haben auch die Anzahl und die Abnahmezeitpunkte der ausgewerteten Proben, die Infusionsdauer, das zur Auswertung verwendete pharmakokinetische Modell und das untersuchte Patientenkollektiv einen großen Einfluss auf die Variabilität der Ergebnisse.

Tab. 2.21: Pharmakokinetische Parameter von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G in ausgewählten klinischen Studien.

Pharmakokinetische Parameter	Irinotecan-Studie (n = 20)	Xiang <i>et al.</i> (2006) (n = 71)	Referenzen	
			Pitot <i>et al.</i> (2000) (n = 12)	Slatter <i>et al.</i> (2000) (n = 8)
Irinotecan				
[‡] C _{max} /Dosis/KOF (m ⁻⁵)	5.1 ± 1.6	4.5 ± 2.2	6.0 ± 1.7	6.3 ± 0.6
[‡] AUC _{0-∞} /Dosis/KOF (h/m ⁵)	40.6 ± 11.9	31.9 ± 20.8	39.4 ± 10.6	36.1 ± 9.1
t _{1/2} (h)	7.4 ± 0.9	7.8 ± 2.5	12.8 ± 1.8	14.6*
CL (l/h/m ²)	13.9 ± 4.9	19.0 ± 14.4	12.1 ± 3.8	12.4 ± 3.0
Vz (l/m ²)	146.6 ± 43.1	k.A.	229.0 ± 91.0	297.0 ± 119.0
SN-38				
[‡] C _{max} /Dosis/KOF (10 ⁻² *m ⁻⁵)	6.1 ± 6.1	11.2 ± 6.9	12.0 ± 7.0	11.1 ± 4.8
[‡] AUC _{0-∞} /Dosis/KOF (h/m ⁵)	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.6	1.4 ± 0.7	1.6 ± 1.0
t _{1/2} (h)	13.2 ± 3.2	15.8 ± 9.0	21.5 ± 5.7	28.5*
SN-38-G				
[‡] C _{max} /Dosis/KOF (10 ⁻¹ *m ⁻⁵)	1.0 ± 0.6	6.1 ± 5.1	2.8 ± 1.1	3.6 ± 1.7
[‡] AUC _{0-∞} /Dosis/KOF (h/m ⁵)	2.1 ± 1.0	6.5 ± 4.3	4.3 ± 2.4	7.2 ± 5.8
t _{1/2} (h)	14.2 ± 3.4	12.9 ± 6.6	19.7 ± 7.0	35.5*
[†]AUC-Verhältnisse				
REC (10 ⁻²)	1.9 ± 1.3	3.9 ± 2.2	5.2 ± 2.2	k.A.
REG	2.6 ± 1.1	9.5 ± 11.3	15.4 ± 7.2	k.A.

[‡]Parameter sind auf verabreichte Irinotecan-Dosis und die Körperoberfläche (KOF) normiert, bei nicht angegebener KOF wurde der Durchschnittswert von 1.95 m² angenommen; *harmonischer Mittelwert;

[†]REC = relative extent of conversion, REG = relative extent of metabolization; k.A. = keine Angaben.

In Tabelle 2.21 sind die pharmakokinetischen Parameter von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, dargestellt.

Zum Vergleich dieser Parameter wurden die Ergebnisse weiterer Studien als Referenz mit in die Tabelle aufgenommen (Xiang *et al.*, 2006; Pitot *et al.*, 2000; Slatter *et al.*, 2000). In allen genannten Studien wurde Irinotecan als 90-minütige Infusion verabreicht. Zur besseren Vergleichbarkeit der AUC- und C_{\max} -Werte, wurden diese auf die jeweils verabreichte Irinotecan-Dosis und die mittlere Körperoberfläche normiert.

Die pharmakokinetischen Parameter der Referenz-Studien wurden ebenso wie die in dieser Studie ermittelten Parameter, mit Hilfe eines nicht-kompartimentellen Modells bestimmt. Auf eine Abschätzung der im Rahmen dieser Studie erhaltenen individuellen Parameter mittels eines 2-oder 3-Kompartiment-Modells wurde aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität verzichtet.

Vergleicht man die hier ermittelten Parameter mit denen der Referenz-Studien, so können keine prägnanten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich die ermittelten Halbwertszeiten von Pitot *et al.* (2000) und Slatter *et al.* (2000) zeigen etwas größere Abweichungen von den Daten der vorliegenden Studie sowie von Xiang *et al.* (2006). Durch einen Vergleich mit weiteren Studien konnten allerdings die hier bestimmten Halbwertszeiten bestätigt werden (Zhou *et al.*, 2005; Rothenberg *et al.*, 2001; Catimel *et al.*, 1995).

In der hier durchgeführten Studie wurde zusätzlich gezeigt, dass Irinotecan einer linearen Pharmakokinetik folgt. In diesem Zusammenhang wurde eine positive Korrelation zwischen der applizierten Dosis und der AUC des Irinotecans beschrieben. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früher durchgeführten Studien (Chabot *et al.*, 1995; Mathijssen *et al.*, 2001; Robert *et al.*, 1998).

In weiteren Studien wurde ebenfalls eine Korrelation zwischen der AUC der Muttersubstanz und der des Metaboliten SN-38 erhalten (Chabot *et al.*, 1995; Catimel *et al.*, 1995), die im Rahmen der hier durchgeführten Studie jedoch nicht bestätigt werden konnte.

2.4.2.2 Pharmakogenetik von Irinotecan

Vor dem eingangs erwähnten Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss ausgewählter genetischer Polymorphismen auf die Pharmakokinetik des Irinotecans untersucht. Ein Teil der hier betrachteten SNPs wurde bereits in früheren Studien auf eine Korrelation mit der Irinotecan-Pharmakokinetik hin überprüft. Im Folgenden sollen die hier ermittelten Ergebnisse mit den literaturbekannten Ergebnissen, soweit vorhanden, verglichen werden.

2.4.2.2.1 Einfluss der untersuchten Polymorphismen des P-Glykoproteins (P-gp) auf die Irinotecan-Pharmakokinetik

P-Glykoprotein ist unter anderem auf der luminalen Seite der Enterozyten des Dün- und Dickdarmes lokalisiert. Es transportiert Arzneimittel, die aus dem Darm in die Zelle aufgenommen wurden, zurück ins Darmlumen. Dadurch entsteht eine funktionelle Absorptionsbarriere. Die Überexpression von P-gp in Tumorzellen gilt heute als wichtige Ursache der *multidrug resistance* gegenüber vielen Zytostatika (Siegmond *et al.*, 2003). Bisher sind ca. 50 verschiedene SNPs und andere genetische Varianten im Gen des P-gps bekannt, von denen einige die Transporteigenschaften des P-gps ändern können. Von diesen wurden schon einige auf eine Korrelation mit der Irinotecan-Pharmakokinetik hin überprüft. Besonders ausführlich wurden in diesem Zusammenhang drei Polymorphismen, namentlich C1236T, G2677T/A und C3435T untersucht. Diese drei Polymorphismen bilden einen sogenannten Haplotypblock, das heißt, dass sie eine hohe Kopplung ihrer allelischen Zustände entlang des DNA-Stranges (*linkage disequilibrium*) vorweisen (de Jong *et al.*, 2006). Zwei dieser Polymorphismen wurden in der vorliegenden Studie eingehend untersucht.

Polymorphismus C1236T

Beim C1236T-Polymorphismus handelt es sich um einen sogenannten stummen Polymorphismus. Stumme Polymorphismen sind Varianten, die keine Veränderung der Funktion des Enzyms bewirken. Allerdings können solche stillen Mutationen Veränderungen der Expression und mRNA-Stabilität verursachen (Mathijssen *et al.*, 2003).

Innerhalb des hier untersuchten Patientenkollektivs (n = 20) wurde der Polymorphismus mit einer Allel-Frequenz von 57% detektiert. Sechs Patienten zeigten die homozygote und elf die heterozygote Ausprägung des SNPs. Vergleicht man die hier ermittelte Allel-Frequenz mit der anderer Studien, so können keine massiven Unterschiede in der ermittelten Häufigkeit festgestellt werden. Allerdings lag die hier evaluierte Frequenz etwas höher, als die der anderen Studien. Komoto *et al.* (2006) konnten den SNP in ihrer Studie (n = 100) mit einer Allel-Frequenz von 46% nachweisen. In zwei aufeinander folgenden Studien von Mathijssen *et al.* (2003 und 2004) wurde die Allel-Frequenz mit 34% (n = 46) und 48% (n = 30) bestimmt. Die Diskrepanz zwischen den ermittelten Werten kann durch die große Heterogenität der teilnehmenden Patienten erklärt werden.

In der bereits erwähnten Studie von Mathijssen *et al.* (2003) wurde der SNP C1236T

auf einen Zusammenhang mit der Pharmakokinetik des Irinotecans untersucht. In der untersuchten Gruppe von 46 Kaukasiern zeigten die Patienten mit homozygoter Ausprägung des Polymorphismus eine signifikant höhere AUC für Irinotecan und den aktiven Metaboliten SN-38. Ein Jahr später untersuchten Mathijssen *et al.* (2004) den SNP erneut in einem Kollektiv von insgesamt 30 Patienten. Diesmal wurden keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die AUCs von Irinotecan und SN-38 gefunden. Es zeichnete sich aber ein Trend ab, bei dem die homozygoten Träger der Mutation niedrigere AUC-Werte für den glucuronidierten Metaboliten SN-38-G aufwiesen.

Im Rahmen der hier durchgeführten Studie wurden keine Unterschiede für die drei Genotypen des SNPs C1236T beim Vergleich der pharmakokinetischen Parameter des Irinotecans festgestellt. Im Unterschied zu der Studie von Mathijssen *et al.* (2003) wurde für die homozygoten Träger der Mutation ein eher gegenteiliger Trend in Bezug auf das SN-38 evaluiert. Hier wiesen die Träger des TT-Genotyps niedrigere AUC-Werte auf als die Träger des CC-Genotyps auf. Die Ergebnisse für den glucuronidierten Metaboliten SN-38-G stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mathijssen *et al.* (2004). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass es sich hier nur um einen Trend handelte, der eine abschließende Beurteilung schwierig macht.

Polymorphismus C3435T

Hoffmeyer *et al.* (2000), beschrieben, dass der ebenfalls stumme C3435T-Polymorphismus mit einer reduzierten intestinalen P-Glykoproteinexpression beim Menschen assoziiert ist. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass C3435T zu einer niedrigeren Transportaktivität führt. Unbekannt ist bis heute, auf welchem Mechanismus die Assoziation zwischen Genotyp und niedriger P-Glykoproteinexpression beruht. Dieser Polymorphismus ist bei Kaukasiern sehr häufig vertreten. In der Studie von Ameyaw *et al.* (2001) wurde die Allel-Frequenz des TT-Genotyps mit 52% bei Kaukasiern bestimmt, Mathijssen *et al.* (2003) evaluierten eine Häufigkeit von 43%. In einer asiatischen Population wurde eine Frequenz von 76% ermittelt (Ameyaw *et al.* 2001). Im Rahmen der vorliegenden Studie mit einer kaukasischen Population wurde er mit einer Allel-Frequenz von 67% nachgewiesen.

Die Untersuchung der Pharmakokinetik des Irinotecans in Abhängigkeit von den Genotypen des C3435T-Polymorphismus, führte in der Studie von Mathijssen *et al.* (2003) zu keinen Ergebnissen, während in einer Studie von Zhou *et al.* (2005) signifikant höhere Irinotecan-Plasmaspiegel bei den Trägern der CT- und

TT-Genotypen detektiert wurden. Im Rahmen der hier durchgeführten Studie konnten keine signifikanten Unterschiede für die betrachteten Genotypen evaluiert werden, was die Ergebnisse von Mathijssen *et al.* (2003) bestärkt. Lediglich die Betrachtung der Mittelwertskurven der Metaboliten wies auf eine geringe Tendenz hin: So erreichten die homozygoten Träger des Wildtyp-Allels im Mittel kleinere maximale Plasmakonzentrationen als die homozygoten Träger der Mutation. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte in der interethnischen Heterogenität gefunden werden. So handelte es sich bei den Patienten von Zhou *et al.* (2005) um Asiaten, während in der hier vorliegenden Studie und in der Studie von Mathijssen *et al.* (2003) Kaukasier untersucht wurden. Eine weitere Hypothese für die Unterschiede der ermittelten Ergebnisse ist, dass der SNP C3435T nur in Kooperation mit seinem Haplotypblock (C1236T und G2677T/A) zu einer veränderten Expression des Transporters führt und auch nur dann Unterschiede zwischen den betrachteten Genotypen zu evaluieren sind (de Jong *et al.*, 2006). Zur Untermauerung dieser Hypothese wurde bereits eine Haplotypanalyse durchgeführt (Sai *et al.*, 2003), die zu dem Ergebnis führte, dass die homozygoten Träger des Haplotyps (C3435T, C1236T und G2677T/A) eine erniedrigte renale Clearance von Irinotecan, SN-38 und dem Metaboliten APC vorwiesen. Ein Einfluss dieses Haplotyps auf die AUCs der untersuchten Analyten konnte jedoch nicht festgestellt werden.

2.4.2.2 Einfluss der untersuchten Polymorphismen des OATP-C-Transporters auf die Irinotecan-Pharmakokinetik

Die Leber ist das Hauptorgan, welches an der Pharmakokinetik von Irinotecan und seinen Metaboliten beteiligt ist. Damit ein gerichteter Transport durch die Hepatozyten möglich ist, werden sowohl Influx- als auch Efflux-Transporter benötigt. Zu der Familie der Influx-Transporter gehören die Organischen Anionen-Transport-Polypeptide (OATP). Unter diesen findet sich der leberspezifische OATP-C-Transporter, welcher für den Transport vieler endogener und exogener Substanzen verantwortlich ist.

In einer *in vitro* Studie von Nozawa *et al.* (2005) wurde erstmals die Beteiligung des OATP-C-Transporters an der Verteilung des Irinotecans beschrieben. Dabei erwies sich besonders der Metabolit SN-38 als gutes Substrat für den Transporter. Des Weiteren konnte belegt werden, dass einige Polymorphismen im Gen des Transporters sich auf dessen Transporteigenschaften auswirken und somit auch den Transport des SN-38 beeinflussen.

Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen der hier durchgeführten Studie zum ersten

Mal *in vivo* der Einfluss ausgewählter SNPs des OATP-C-Transporters (Wildtyp = OATP-C*1a, A388G = OATP-C*1b, T521C = OATP-C*5, G721A = OATP-C*1c und A388G + T521C = OATP-C*15) auf die Pharmakokinetik des Irinotecans untersucht werden. Zeitgleich zu der hier durchgeführten Studie, beschäftigte sich ebenfalls eine asiatische Arbeitsgruppe mit diesem Thema (Xiang *et al.*, 2006). Die Ergebnisse der beiden Studien sollen im Folgenden diskutiert werden.

Beim Vergleich der beiden Patientenkollektive hinsichtlich der ermittelten Allel-Frequenzen (Tab. 2.22) fällt auf, dass sich die beiden Patienten-Populationen voneinander unterscheiden. In der Studie von Xiang *et al.* (2006) zeigten die Patienten den Polymorphismus OATP-C*1b mit einer mehr als doppelt so starken Allel-Frequenz, wie die Patienten der vorliegenden Studie. Für die Doppelmutation OATP-C*15 verhielt es sich genau entgegengesetzt.

Tab. 2.22: Genotyp- und Allel-Frequenzen der untersuchten Gene.

Genotypen	Xiang <i>et al.</i> (2006)		Irinotecan-Studie	
	N [n=71]	Allel-Frequenzen [%]	N [n=20]	Allel-Frequenzen [%]
OATP-C*1a/OATP-C*1a	6	24.6	7	52.5
OATP-C*1a/OATP-C*1b	23		5	
OATP-C*1b/OATP-C*1b	31	66.9	1	30.0
OATP-C*1a/OATP-C*15	0		2	
OATP-C*1b/OATP-C*15	10		5	
OATP-C*15/OATP-C*15	1	8.5	0	17.5

Die Unterschiede in den Allel-Frequenzen können wahrscheinlich durch die hohe interethnische Varianz (kaukasische *vs.* asiatische Patienten-Population) erklärt werden. So stehen die ermittelten Allel-Frequenzen von Xiang *et al.* (2006) in Übereinstimmung mit den Allel-Frequenzen, die in einer japanischen Population bestimmt wurden (Nozawa *et al.*, 2002). Ebenso können die im Rahmen dieser Studie ermittelten Allel-Frequenzen bestätigt werden. In einer Studie von Tirona *et al.* (2001) wurden in einer europäisch-amerikanischen Population Allel-Frequenzen von 30% für den OATP-C*1b- und von 14% für den OATP-C*15-Polymorphismus detektiert.

Um die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Xiang *et al.*

(2006) in Bezug auf die Genotyp-Phänotyp Assoziationen vergleichen zu können, mussten diese zunächst auf dieselben Einheiten normiert werden. Des Weiteren haben Xiang *et al.* (2006) eine andere Einteilung der Genotypen für Ihre Auswertung gewählt, so dass die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit an diese angeglichen wurden. In Tabelle 2.23 sind die Ergebnisse beider Studien zusammengefasst.

Tab. 2.23: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter der Haplotypen OATP-C*1a, OATP-C*1b und OATP-C*15 (Mittelwerte \pm SD).

Pharmakokinetische Parameter	Xiang <i>et al.</i> (2006)			Irinotecan-Studie		
	*1a/*1a	*1a/*1b + *1b/*1b	*1b/*15	*1a/*1a	*1a/*1b + *1b/*1b	*1b/*15
n	6	54	11	4	4	6
Irinotecan						
$C_{max}/\text{Dosis}/\text{KOF}$ (m^{-5})	3.0 \pm 1.4	4.5 \pm 2.2	5.5 \pm 2.1	5.1 \pm 0.8	4.9 \pm 0.9	4.8 \pm 0.9
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{Dosis}/\text{KOF}$ (h/m^5)	17.3 \pm 6.3	32.0 \pm 22.1	39.3 \pm 15.2	41.1 \pm 5.5	42.8 \pm 12.4	44.5 \pm 13.0
CL ($\text{l}/\text{h}/\text{m}^2$)	28.9 \pm 11.0	19.9 \pm 15.1	9.6 \pm 3.2	12.7 \pm 1.7	12.8 \pm 3.6	12.2 \pm 3.5
SN-38						
$C_{max}/\text{Dosis}/\text{KOF}$ ($10^{-2}*\text{m}^{-5}$)	6.0 \pm 3.9	10.9 \pm 6.7	13.8 \pm 6.0	5.8 \pm 0.3	4.2 \pm 1.8	4.6 \pm 1.8
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{Dosis}/\text{KOF}$ (h/m^5)	0.7 \pm 0.3	1.0 \pm 0.6	1.3 \pm 0.5	0.8 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2
SN-38-G						
$C_{max}/\text{Dosis}/\text{KOF}$ ($10^{-1}*\text{m}^{-5}$)	11.9 \pm 0.8	6.3 \pm 0.5	2.3 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.4
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{Dosis}/\text{KOF}$ (h/m^5)	12.0 \pm 6.1	6.5 \pm 3.8	3.6 \pm 2.0	1.9 \pm 0.6	1.5 \pm 0.7	1.6 \pm 0.8
‡AUC-Verhältnisse						
REC (10^{-2})	4.6 \pm 2.9	3.9 \pm 2.1	3.6 \pm 2.2	1.8 \pm 0.6	1.2 \pm 1.0	1.5 \pm 1.0
REG	27.0 \pm 27.1	8.9 \pm 7.5	3.1 \pm 2.3	2.7 \pm 0.9	2.6 \pm 1.1	2.6 \pm 1.1

*1a/*1a = Wildtyp; *1a/*1b = heterozygote Träger des SNPs A388G; *1b/*1b = homozygote Träger des SNPs A388G; *1b/*15 = Träger der Doppelmutation.

‡REC = relative extent of conversion, REG = relative extent of metabolization.

Xiang *et al.* (2006) konnten in ihren Untersuchungen mehrere signifikante Unterschiede zwischen den Haplotypen feststellen. Im Vergleich zu den Trägern des Referenz-Genotyps (*1a/*1a) zeigten die Träger der Doppelmutation (*1b/*15) eine

dreimal geringere Irinotecan-Clearance ($p = 0.001$). Dementsprechend wurden bei diesen Patienten signifikant höhere AUC-Werte für Irinotecan und SN-38 gefunden ($p = 0.003$, $p = 0.021$). Beim SN-38-G waren die Ergebnisse genau entgegengesetzt. Hier zeigten die Patienten mit dem Referenz-Genotyp signifikant höhere AUC-Werte, als die Träger der Doppelmutation ($p = 0.01$). Beim Vergleich der Glucuronidierungskapazitäten wurde für den REG-Wert ein ebenfalls signifikantes Ereignis gefunden. Die Patienten mit der Doppelmutation wiesen ein neunfach schlechteres Glucuronidierungsverhältnis auf als die Patienten mit dem Referenz-Genotyp.

Im Gegensatz zu der von Xiang *et al.* (2006) durchgeführten Studie, wurden in der hier vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Haplotypen festgestellt. Eine Erklärung für die Diskrepanz dieser Ergebnisse kann ebenfalls in der interethnischen Heterogenität gefunden werden. Ein Aspekt der dafür spricht ist die Tatsache, dass sich die beiden Patienten-Populationen in der Genotypen-Verteilung stark voneinander unterscheiden.

Vergleicht man die Referenz-Genotypen der beiden Patienten-Populationen miteinander, so fallen auch hier Unterschiede auf. Die Patienten kaukasischer Abstammung zeigen mehr als doppelt so hohe Irinotecan-AUCs, als die asiatischen Patienten. Dementsprechend weisen die asiatischen Patienten eine sehr viel höhere Irinotecan-Clearance auf. Während für den Metaboliten SN-38 keine massiven Unterschiede zwischen den Populationen festgestellt werden, zeigen die asiatischen Patienten sechsmal höhere AUCs für den Metaboliten SN-38-G.

2.4.2.2.3 Einfluss des untersuchten Polymorphismus der UDP-Glucuronyltransferase UGT1A1 auf die Irinotecan-Pharmakokinetik

Das Enzym UGT1A1 ist physiologischerweise verantwortlich für die Entgiftung des Bilirubins, indem dieses zur besseren Ausscheidung glucuronidiert wird (de Jong *et al.*, 2005). Das Gen zu diesem Enzym ist polymorph, wobei einige Polymorphismen die Expression und die Funktion des Enzyms beeinflussen können. Drei Hyperbilirubinämie-Syndrome, die auf eine verminderte UGT1A1-Expression bzw. auf den totalen Ausfall des Enzyms zurückzuführen sind, konnten mit bestimmten Polymorphismen in Verbindung gebracht werden (Ando *et al.*, 2000). Der am häufigste untersuchte Polymorphismus ist eine Dinukleotid-Insertion (UGT1A1*28) in der Promoterregion des UGT1A1-Gens. Dieser Polymorphismus konnte ebenfalls mit einer erhöhten Toxizität des Irinotecans in Verbindung gebracht werden (Sai *et al.*, 2004).

UGT1A1*28

In den bisherigen Studien (mit kaukasischen Populationen) wurden Allel-Frequenzen von 27 bis 38% in Bezug auf den Genotyp 7/7 ermittelt (Innocenti *et al.*, 2004; Iyer *et al.*, 2002a; Paoluzzi *et al.*, 2004; Mathijssen *et al.*, 2004). In der hier durchgeführten Studie wurde eine Allel-Frequenz von 35% evaluiert, wobei keiner der untersuchten Patienten den Polymorphismus in homozygoter Ausprägung zeigte.

In der Literatur wurde bereits ein Zusammenhang des Polymorphismus mit der Irinotecan-Pharmakokinetik beschrieben, insofern dass bei Vorliegen der homozygoten Mutation die Glucuronidierung des aktiven Metaboliten SN-38 reduziert ist (Innocenti *et al.*, 2004; Iyer *et al.*, 2002; Paoluzzi *et al.*, 2004; Mathijssen *et al.*, 2004). Bemerkbar macht sich dieses vorrangig in einem signifikanten Anstieg der SN-38-AUC. Bei der Überprüfung der Metabolisierungsaktivität (REG-Wert) konnte für die Träger der homozygoten Mutation ein signifikant kleinerer Wert gefunden werden als für die Träger des Wildtyps.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den hier in dieser Studie ermittelten Daten ist schwierig, da keiner der Patienten homozygoter Träger der Mutation war. Dennoch zeigte sich ein Trend, der die oben dargestellten Ergebnisse klar untermauert. So zeigten die heterozygoten Träger der Mutation höhere AUC-Werte für den aktiven Metaboliten SN-38 ($p = 0.09$), während die AUCs für den glucuronidierten Metaboliten eher erniedrigt waren. Bei der Untersuchung der REG-Werte zeigte sich, dass die Träger des Wildtyps eine signifikant höhere Metabolisierungsaktivität aufwiesen, was ebenso in Übereinstimmung mit den literaturbekannten Ergebnissen steht.

Zusammenfassend muss für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Polymorphismen bedacht werden, dass auch die Analyse genetischer Daten unter Umständen tatsächlich vorliegende Einflüsse verschleiern oder nicht-replizierbare Ergebnisse kreieren kann. Da genetische Varianten nicht isoliert auftreten, sondern in Blöcken vererbt werden, kann es vorkommen, dass stille Polymorphismen, die selbst keine funktionelle Bedeutung haben, mit anderen, funktionell bedeutsamen verknüpft sind. Eine Untersuchung dieser sogenannten Haplotyp-Blöcke könnte die Aussagen über funktionell bedeutsame Varianten in Zukunft vielleicht verbessern (Kircheiner, 2004).

2.4.2.3 Toxizität

In dieser Arbeit wurden neben der Diarrhöe, welche eine der dosis-limitierenden Nebenwirkungen darstellt, die Hämato-, Hepato- und Nephrotoxizität nach einer Irinotecan-Gabe erfasst und anhand der in Kap. 2.2.5.3 beschriebenen Skalen beurteilt. Bei allen unerwünschten Wirkungen ist zu beachten, dass ihr Auftreten nicht zwingend mit der Irinotecangabe verknüpft sein muss, sondern auch durch die Zusatzmedikation hervorgerufen worden sein kann. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die entsprechenden Symptome primär durch die Tumorerkrankung verursacht wurden. Andere Erkrankungen der Patienten und die im Vorfeld verabreichten Chemotherapien könnten die Ausprägung der Toxizität ebenfalls beeinflusst haben.

Die Erfassung der Hämato-, Hepato- und Nephrotoxizität erfolgte anhand der routinemäßig bestimmten Laborparameter, die einheitlich für alle untersuchten Applikationsschemata mit Hilfe der NCI-CTC-Kriterien (s. Kap. 5.1) beurteilt wurden. Alle drei Arten der Toxizität traten im Rahmen dieser Arbeit nur selten und in niedrigen Schweregraden auf.

In 18% der Fälle kam in der hier vorliegenden Studie eine leichte Hämatotoxizität in Form von Leukopenie, Anämie oder Thrombozytopenie vor. Die Leukopenie stellte dabei die wichtigste hämatologische Nebenwirkung dieser Studie dar. Dieses Ergebnis wird auch durch die anderen Studien bestätigt (Chabot, 1997; Robert *et al.*, 1998; Rothenberg *et al.*, 2001; Pitot *et al.*, 2000). Dort konnte ermittelt werden, dass die auftretende Leukopenie dosis- und applikationsplan-abhängig ist.

Die leichte Hepatotoxizität, die sich im Rahmen der vorliegenden Studie als transienter, leichter bis moderater Anstieg der Leberenzymwerte äußerte, wurde nicht weiter untersucht. Die Häufigkeit der hier beobachteten hepatotoxischen Symptome ist vermutlich auf die Chemotherapie zurückzuführen, da Patienten, welche an einem fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom leiden, häufig Metastasen in der Leber aufweisen (Fong *et al.*, 1995), durch die auch Veränderungen der Leberwerte hervorgerufen werden können.

Wichtigste Nebenwirkung von Irinotecan war die verzögert auftretende Diarrhö, welche sich bei 65% der im Rahmen dieser Studie behandelten Patienten manifestierte. 15% der Patienten zeigten eine Diarrhö des Grades 2 oder 3, eine Diarrhö des Grades 4 konnte nicht festgestellt werden. In den überwiegenden anderen Phase I- und Phase II-Untersuchungen trat eine verzögerte Diarrhö dosisabhängig mit einer Inzidenz von 60 - 87% auf. Eine Diarrhö des Grades 3 oder

4, wurde dabei mit einer Häufigkeit von 20 - 40% festgestellt (Hecht, 1998).

Im Vergleich zu den drei oben genannten Arten der Toxizität (Hämato-, Hepato- und Nephrotoxizität) ist die korrekte Zuordnung des Diarrhö-Schweregrades sehr schwierig. Die Erfassung erfolgte zum einen durch direkte Befragung der Patienten und zum anderen durch den behandelnden Onkologen. In der Regel sind solche Angaben subjektiv, des Weiteren ist es schwierig für die Patienten die Dauer der Beschwerden genau anzugeben.

Im Allgemeinen kann festgehalten werden, dass sich zwar unerwünschte Nebenwirkungen manifestierten, diese sich aber bei der Mehrzahl der Patienten eher moderat äußerten.

2.4.2.4 Zusammenhänge von pharmakokinetischen Parametern mit klinischen Effekten unter Berücksichtigung der Pharmakogenetik

In dieser Arbeit wurde die Irinotecan-Pharmakokinetik und hier insbesondere die Pharmakokinetik des Metaboliten SN-38, unter besonderer Berücksichtigung der Pharmakogenetik, auf Zusammenhänge mit der aufgetretenen Toxizität geprüft, wobei der Schwerpunkt auf den Patienten lag, die eine Irinotecan-Dosis von 180 mg/m² erhalten haben.

Hinsichtlich der Hepatotoxizität zeigten sich für alle untersuchten Patienten keine Zusammenhänge mit den untersuchten pharmakokinetischen Parametern. Dies korrespondiert mit der Tatsache, dass hepatotoxische Effekte unter einer Irinotecantherapie nur in sehr seltenen Fällen auftreten und wahrscheinlich eher auf die komedizierten Arzneimittel oder eine Lebermetastasierung im Zuge des kolorektalen Karzinoms zurückzuführen sind.

Für die Hämatotoxizität hinsichtlich der Hämoglobin- und Thrombozyten-Konzentrationen konnte keine Auswertung vorgenommen werden, da jeweils nur ein Patient eine moderate Toxizität zeigte.

Eine leichte bis mäßige Leukopenie (Toxizitätsgrad 1 - 2) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei drei Patienten festgestellt werden. Beim Vergleich der SN-38-AUCs zeichnete sich ein leichter Trend dahingehend ab, dass die Patienten mit Leukopenie etwas höhere mediane AUC-Werte erreichten, als die Patienten ohne Leukopenie.

In Studien mit größeren Patientenkollektiven korrelierte die AUC des Irinotecans

signifikant mit der prozentualen Abnahme der Leukozyten und hier insbesondere mit der Abnahme der neutrophilen Granulozyten (Catimel *et al.*, 1995; Abigeres *et al.*, 1995; Chabot *et al.*, 1995). Ähnliche Ergebnisse erhielt man in diesem Zusammenhang auch für den sehr viel stärker zytotoxisch wirksamen Metaboliten SN-38 (Chabot *et al.*, 1995).

Unter besonderer Berücksichtigung der Pharmakogenetik, findet man in der Literatur Ergebnisse, dass die Inzidenz des Auftretens schwerer Neutropenien mit dem UGT1A1*28-Polymorphismus in Zusammenhang gebracht werden kann (Rouits *et al.*, 2004).

In der hier vorliegenden Studie können keine konkreten Aussagen diesbezüglich getroffen werden, da keiner der drei „Leukopenie-Patienten“ den Polymorphismus in homozygoter Ausprägung aufwies. Es kann jedoch festgehalten werden, dass alle drei Patienten den Polymorphismus in heterozygoter Form zeigten.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der AUC des Metaboliten SN-38 und der Diarrhö konnte im Rahmen der hier vorliegenden Studie nicht evaluiert werden. Es liegt allerdings ein Trend vor, der darauf hindeutet, dass die unter der Diarrhö leidenden Patienten etwas höhere AUC-Werte zeigten, als die anderen Patienten.

In der Literatur findet man diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse. So konnte in einigen Studien, mit kaukasischen Populationen, die Schwere der auftretenden Diarrhö mit der maximalen SN-38-Plasmakonzentration (Kudoh *et al.*, 1995) und der SN-38-AUC korreliert werden (Chabot *et al.*, 1995). In anderen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Glucuronidierungskapazität des Metaboliten SN-38 und der Diarrhö beschrieben (Gupta *et al.*, 1994). In einer Studie von Zhou *et al.* (2005) mit asiatischen Patienten konnte weder das eine noch das andere Ergebnis bestätigt werden.

Die Diskrepanz dieser Ergebnisse kann damit erklärt werden, dass unterschiedlich große Patientenkollektive untersucht wurden und dass in den verschiedenen Studien die Toxizitäten nach unterschiedlichen Maßstäben bewertet wurden (Chabot, 1997). Eine weiterführende Erklärung findet man unter Berücksichtigung der Pharmakogenetik, da sich die genetische Variabilität auf die Pharmakokinetik auswirken kann. So wurde bei Vorliegen des UGT1A1*28-Polymorphismus mehrfach von einer erhöhten Inzidenz für das Auftreten schwerer Diarrhöen berichtet (Marcuello *et al.*, 2004; Ando *et al.*, 2000).

Des Weiteren wurden in erwähnten Studien unterschiedliche Populationen untersucht, so dass interethnische Differenzen für die Diskrepanzen verantwortlich sein können. Für die Hypothese mit den Populationen spricht vor allem die Tatsache, dass Asiaten den Polymorphismus UGT1A1*28 mit einer relativ niedrigen Allel-

Frequenz von 7% aufweisen, während diese in einer kaukasischen Population 35% ausmacht (de Jong *et al.*, 2006).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten keine Aussagen bezüglich eines Zusammenhanges zwischen dem Auftreten eines SNPs und der auftretenden Diarrhö getätigt werden, da das Patientenkollektiv dafür zu klein war. Auffällig war jedoch, dass die Patienten, welche von schwerwiegenderen Durchfällen (Toxizitätsgrad 2 - 3) betroffen waren, bei jedem der hier untersuchten Polymorphismen eine heterozygote oder sogar homozygote Mutation aufwiesen.

2.4.2.5 Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik

Genetische Faktoren sind nur ein Teil der vielen Einflussgrößen, welche für individuelle Unterschiede in der Arzneimittelwirkung verantwortlich sind. Für eine individuelle Behandlung von Patienten müssen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Körperoberfläche, Körpergröße und Body Mass Index, als mögliche Einflussfaktoren in Betracht genommen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese patientenindividuellen Faktoren in Bezug auf die Irinotecan-Pharmakokinetik geprüft.

Diesbezüglich wurde in der vorliegenden Arbeit ein positiver, statistisch signifikanter Zusammenhang der AUC des aktiven Metaboliten SN-38 mit dem Alter ermittelt. Mit zunehmendem Alter kommt es oft zu Veränderungen biologischer Funktionen, woraus sich mögliche nachteilhafte Konsequenzen für die medikamentöse Tumorthherapie ergeben. Der Metabolismus des Irinotecans findet zum größten Teil in der Leber statt (Chabot, 1997). Zwar nimmt die Leberdurchblutung mit dem Alter ab, aber dennoch ergaben sich daraus bisher keine altersbedingten Veränderungen für den Großteil der Zytostatika-Therapien (Bokemeyer *et al.*, 1998). Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Altersabhängigkeit könnte man in einer reduzierten Glucuronidierungskapazität finden. Bei Annahme dieser Hypothese hätte sich allerdings auch eine diesmal negative Korrelation für die AUC des glucuronidierten Metaboliten SN-38-G ergeben müssen, die hier jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Eine schlüssige Erklärung kann anhand der gewonnenen Daten nicht gegeben werden. Eine klinische Relevanz konnte diesem Ergebnis in der hier vorliegenden Studie nicht beigemessen werden, da sich für die älteren Patienten keine erhöhte Toxizität nachweisen ließ.

Für die anderen eingangs erwähnten Parameter konnten im Rahmen dieser Studie keine Zusammenhänge mit der Pharmakokinetik ermittelt werden.

3 PHASE-IV-STUDIE ZUR OPTIMIERUNG DER IDARUBICIN-THERAPIE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER INFUSIONSDAUER

3.1 Einleitung

3.1.1 Leukämien

In Deutschland erkranken nach Angaben des Robert-Koch-Institutes jährlich etwa 9 900 Menschen neu an Leukämie. Der Begriff Leukämie steht dabei für eine Gruppe von Krebserkrankungen des blutbildenden Systems (hämatopoetisches System), die sich bezüglich Häufigkeit, Ursachen, Behandlungsmöglichkeiten und Heilungsaussichten zum Teil stark voneinander unterscheiden (Deutsche Krebshilfe, 2005). Eine Leukämie ist in der Regel durch eine stark erhöhte Leukozytenzahl im Blut gekennzeichnet.

Alle hämatopoetischen Zellen, d.h. Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten werden von einer undifferenzierten pluripotenten Stammzelle, der sog. „Mutterzelle“ im Knochenmark durch Proliferations- und Differenzierungsprozesse gebildet (Fauser, 1997). Dabei entstehen über weiter differenzierte linienspezifische Vorläuferzellen schließlich die ausdifferenzierten Effektorzellen des peripheren Blutes (s. Abb. 3.1).

Auf jeder ihrer Entwicklungsstufen können die Zellen entarten, also bösartig werden. Dabei verlieren leukämische Zellen die Fähigkeit der Ausreifung zu funktionsfähigen Blutzellen und entziehen sich den normalen Kontrollmechanismen von Zellwachstum und Differenzierung (Kern *et al.*, 2003). Es kommt zur Expansion der leukämischen Zellpopulation und zur Verdrängung der normalen Blutbildung im Knochenmark. Die Folgen sind eine dramatische Verminderung der Erythrozyten, Granulozyten sowie der Thrombozyten. Die betroffenen Patienten leiden an einer schweren Anämie, haben ein hohes Risiko an rasch und gefährlich verlaufenden Infektionen zu erkranken und neigen verstärkt zu Blutungen (Deutsche Krebshilfe, 2005).

Je nach Art der Leukozyten, aus denen die Leukämiezellen hervorgehen, spricht man von einer myeloischen oder einer lymphatischen Leukämie. Myeloische Leukämien gehen von Vorläuferzellen der Granulozyten, lymphatische Leukämien von Vorläuferzellen der Lymphozyten aus. Von beiden Leukämiearten gibt es im Wesentlichen jeweils eine akut und eine chronisch verlaufende Form.

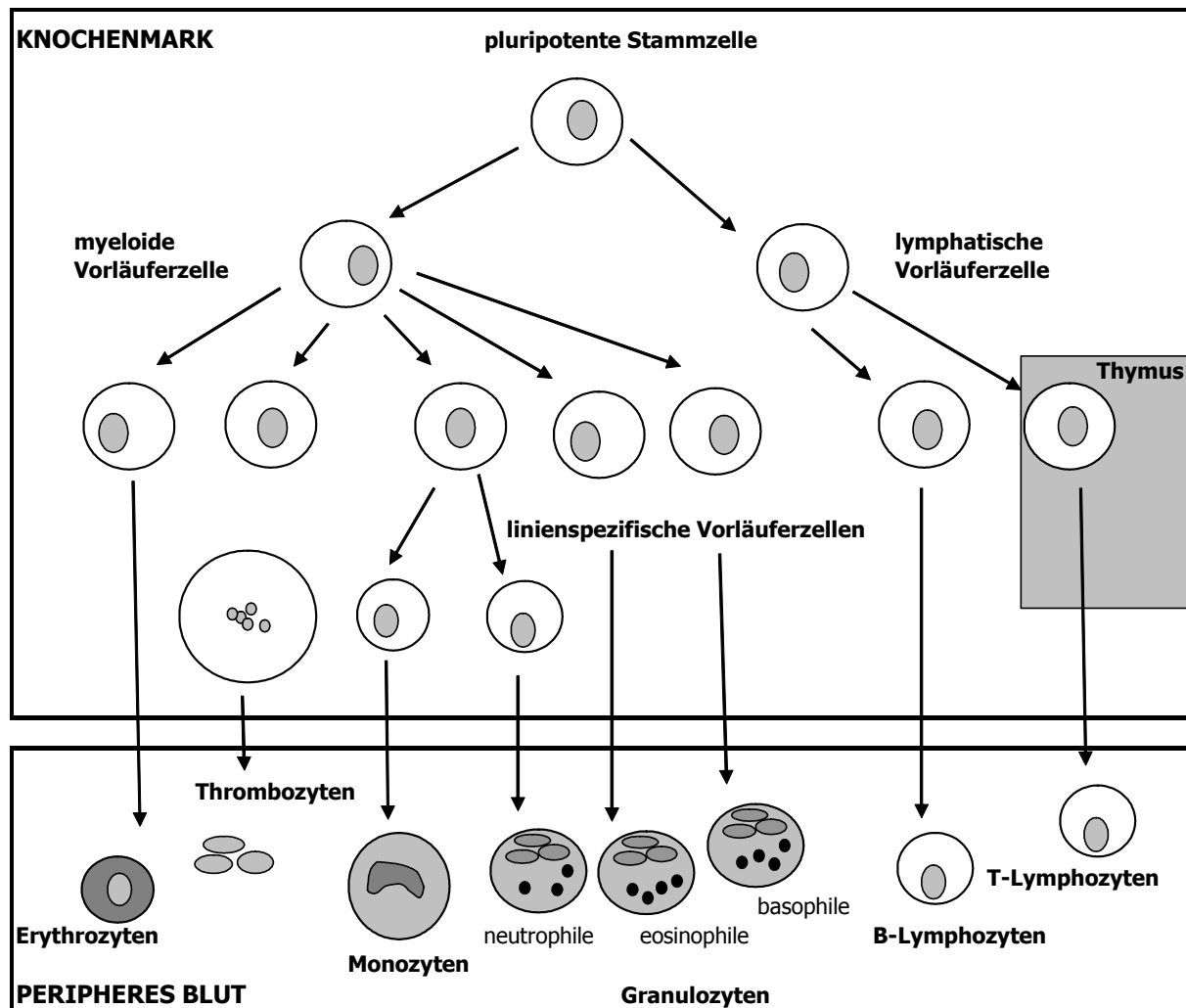


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Hämatopoese (Modell modifiziert nach Fauser et al., 1997).

Die Erkrankungshäufigkeit steigt mit dem Alter an, da fast drei Viertel der Betroffenen zum Zeitpunkt der Diagnose über 60 Jahre alt sind. Die akute myeloische Leukämie (AML) macht etwa 80% aller akuten Leukämien im Erwachsenen- und 20% aller Leukämien im Kindesalter aus. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste Leukämieform bei Kindern (Wehmeier *et al.*, 2001).

Trotz ihrer relativen Seltenheit (bei weniger als 3% aller Krebserkrankungen handelt es sich um akute Leukämien) haben die akuten Leukämien einen überproportionalen Anteil an der Sterblichkeit jüngerer Patienten.

Als Risikofaktoren sind Exposition gegenüber Benzol oder ionisierender Strahlung, aber auch Viruserkrankungen bekannt (Deutsche Krebshilfe, 2005). Mit dem Auftreten einer akuten Leukämie als sogenannte Sekundärneoplasie muss auch nach einer chemotherapeutischen und radiotherapeutischen Vorbehandlung gerechnet werden (Wehmeier *et al.*, 2001).

3.1.1.1 Entstehung und Entwicklung der akuten Leukämien

Obwohl Leukämien erworbene Erkrankungen sind, stellen gewisse genetische Veränderungen wie Down-Syndrom, Fanconi-Anämie und andere Syndrome mit genetischer Instabilität eine Prädisposition für die Leukämie-Entwicklung dar (Wehmeier *et al.*, 2001).

In Leukämiezellen treten mikroskopisch sichtbare Chromosomenveränderungen – sogenannte Translokationen – auf. Diese Translokationen können das zelluläre Gleichgewicht über zwei unterschiedliche Mechanismen stören: Entweder bilden sich Fusionsgene, bestehend aus Genabschnitten von beiden – nun fusionierten – Chromosomen, oder es kommt zur transkriptionellen Deregulierung von Genen, die in der Nähe der chromosomalen Bruchstellen lokalisiert sind. Beide bewirken letztlich eine Störung der zellulären Regulation und führen zum unkontrollierten Wachstum der Zellpopulation (Bohlander *et al.*, 2000).

Bei der akuten myeloischen Leukämie sind Deletionen an den Chromosomen 5 und 7, eine Trisomie 8 und komplexere chromosomale Aberrationen (Abweichungen) schlechte Prognosefaktoren, während die Translokationen t(8; 21) und t(15; 17) sowie Aberrationen am Chromosom 16 eine bessere Prognose bedeuten.

Bei der akuten lymphatischen Leukämie haben die Patienten mit einer sogenannten Philadelphia-Translokation t(9; 22) und einer t(4; 11)-Translokation eine besonders ungünstige Prognose. (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 2000).

3.1.1.2 Therapie der akuten Leukämien

Die bisherige Therapie akuter Leukämien ist darauf ausgerichtet, die leukämischen Zellen zu zerstören und die normale Blutbildung wieder herzustellen. Mit Hilfe intensiver Chemotherapiekombinationen gelingt es heute, bei ca. 60 - 80% der Patienten die Leukämiezellpopulation vorübergehend zu unterdrücken und eine sogenannte Remission, d.h. eine scheinbare Krankheitsfreiheit, zu erreichen. In der Mehrzahl aller Fälle kommt es jedoch nach wenigen Monaten oder einigen Jahren zu einem Rückfall der Erkrankung und einem letztlich tödlichen Verlauf. Eine dauerhafte Krankheitsfreiheit und endgültige Heilung ist derzeit trotz wesentlicher Verbesserungen der Chemotherapie und supportiver Maßnahmen nur bei ca. 30 - 40% aller betroffenen Patienten erreichbar (Kern *et al.*, 2003).

Die Behandlung der akuten Leukämien kann trotz der Fortschritte durch die intensiviertere Chemotherapie nicht als standardisiert gelten. Sowohl die Art der Induktions- als auch der Postremissionsbehandlung sowie die zeitliche Abfolge der verschiedenen Therapieschritte, Art und Zeitpunkt einer integrierten

Knochenmarktransplantation sind Gegenstand zahlreicher Therapiestunden (Kern *et al.*, 2003).

3.1.1.2.1 Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML)

Das Therapiekonzept der AML lässt sich in zwei Phasen unterteilen (Kern *et al.*, 2003; Leitlinien des Westdeutschen Tumorzentrums Essen, 2000):

Induktionstherapie

Das primäre Ziel besteht in der Induktion einer kompletten Remission (CR) (s. Kap. 3.2.4.3) durch Applikation von 1 - 2 Induktionstherapiezyklen. In der Induktionstherapie wird ein Anthrazyklinderivat wie Daunorubicin oder Idarubicin mit dem Antimetaboliten Cytarabin kombiniert. Standarddosiertes Cytarabin wird meist als Dauerinfusion von 200 mg/m² über 5 Tage oder 100 mg/m² über 7 Tage gegeben. Die Applikation von höher dosiertem Cytarabin, z.B. 3 g/m² alle 12 Stunden über 3 - 6 Tage, führt manchmal zu einer höheren Remissions-Rate, jedoch auch zu einem Anstieg der therapiebedingten Toxizität (Bishop *et al.*, 1998). Die Verwendung einer dritten Substanz in der Induktion, wie z.B. des Antimetaboliten Thioguanin oder des Topoisomerase-Inhibitors Etoposid, wird von einigen Gruppen empfohlen (Kern *et al.*, 2003). Ein zweiter Induktionskurs kann ebenfalls als Intensivierung der Induktionstherapie mit dem Ziel einer erhöhten Remissions-Rate durchgeführt werden.

Postremissions-Chemotherapie

Bei Erreichen einer kompletten Remission (s. Kap. 3.2.4.3) werden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Postremissionstherapien empfohlen und durchgeführt. Diese haben das Ziel, noch vorhandene, wenn auch nicht mehr erkennbare Leukämiezellen, zu vernichten. Die Postremissionstherapie wird ca. 2 - 4 Wochen nach Restitution der peripheren Blutwerte durchgeführt. Zahlreiche Studiengruppen bemühen sich um die Optimierung dieser Therapie (Kern *et al.*, 2003). Prinzipiell lässt sich die intensivierte Konsolidierungstherapie mit 1 - 4 Zyklen einer konventionellen Chemotherapie unter Verwendung von hoch dosiertem Cytarabin von der myeloablativen Therapie durch Ganzkörperbestrahlung oder Cyclophosphamid/Busulfan gefolgt von autologer Knochenmark- bzw. peripherer Stammzelltransplantation unterscheiden.

Bei der AML wird nach intensiver Induktions- und Konsolidationstherapie meist auf eine Erhaltungstherapie verzichtet.

3.1.1.2.2 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)

Die Stratifizierung der Therapie erfolgt anhand einer Kombination prognostischer Faktoren, die bei der Diagnose erfasst werden. International werden neben seltenen molekulargenetischen Veränderungen vor allem die initiale Leukozytenzahl, das Alter und das Ansprechen auf die Therapie, daneben von einigen Gruppen der Immunphänotyp und die Ploidie als wichtigste Risikofaktoren angesehen (AWMF-Leitlinien-Register, 2005).

Die Therapie der ALL besteht im Wesentlichen aus vier tragenden Elementen, in denen die Abfolge und die Dosierung der Zytostatika anhand der prognostischen Faktoren festgelegt werden, wobei sich die Steuerung noch an bestimmten Richtwerten orientiert (Lipp *et al.*, 2003). Einzelne Substanzen werden sowohl als niedrig dosierte i.v.-Injektion als auch als hoch dosierte Dauerinfusion verabreicht, was besondere Anforderungen an die Überwachung stellt. Die wichtigsten Zytostatika der ALL-Therapie sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Grundsätzlich kommt immer nur eine Auswahl der genannten Substanzen in vorher festgelegter Abfolge zum Einsatz.

Tab. 3.1: Wichtigste Zytostatika der ALL-Therapie. (Quelle: <http://www.awmf-online.de/>).

Behandlungsteil*	Zytostatika [‡]
I. Induktionstherapie	Prednison, Vincristin, Daunorubicin, Asparaginase, Methotrexat, Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Mercaptopurin, Idarubicin
II. Konsolidierungstherapie	6-Mercaptopurin, Methotrexat
III. Reinduktionstherapie	Dexamethason, Asparaginase, Doxorubicin, Vincristin, Cytarabin, Cyclophosphamid, Thioguanin
IV. Erhaltungstherapie	6-Mercaptopurin, Methotrexat

*Die Terminologie wird in den Behandlungsprogrammen z.T. unterschiedlich verwendet.

[‡]Auswahl der Zytostatika je nach Therapieregime.

3.1.2 Anthrazykline in der Chemotherapie

Anthrazykline gehören zu den am häufigsten verwendeten und wichtigsten Chemotherapeutika bei der Behandlung unterschiedlicher Tumore. Seit den späten 50er Jahren wurden Anthrazyklin-Antibiotika aus *Streptomyces peucetius* isoliert. Farmitalia Research Laboratories in Mailand (Arcamone *et al.*, 1961) und die Pariser Gruppe der Rhone-Poulenc Laboratories (Dubost *et al.*, 1963) entwickelten gleichzeitig die erste klinisch relevante Substanz Daunorubicin (Abb. 3.2). Erfolge mit Daunorubicin wurden in der Behandlung der akuten myeloblastischen (Boiron *et al.*, 1969) und lymphoblastischen Leukämie (Jacquillat *et al.*, 1966), sowie soliden Tumoren im Kindesalter (Tan *et al.*, 1965) erzielt. Es wurden aber auch eine Reihe von toxischen Nebenwirkungen wie Knochenmarkshypoplasien, Alopezie, *extravasalen* Nekrosen und vor allem einer medikamentös nicht beherrschbaren Kardiotoxizität bekannt (Booser *et al.*, 1994).

In den folgenden Jahren wurden über 2000 verschiedene Derivate aus der Muttersubstanz durch biochemische Modifikation der Aglykone und Zucker-Anteile entwickelt, doch bisher werden nur Doxorubicin, Epirubicin und Idarubicin (Abb. 3.2) in der klinischen Routine verwendet (Borchmann *et al.*, 1997). Die wichtigsten Ziele bei der Entwicklung neuer Anthrazykline sind ein erhöhtes Aktivitätsspektrum und eine reduzierte Kardiotoxizität (Binaschi *et al.*, 2001).

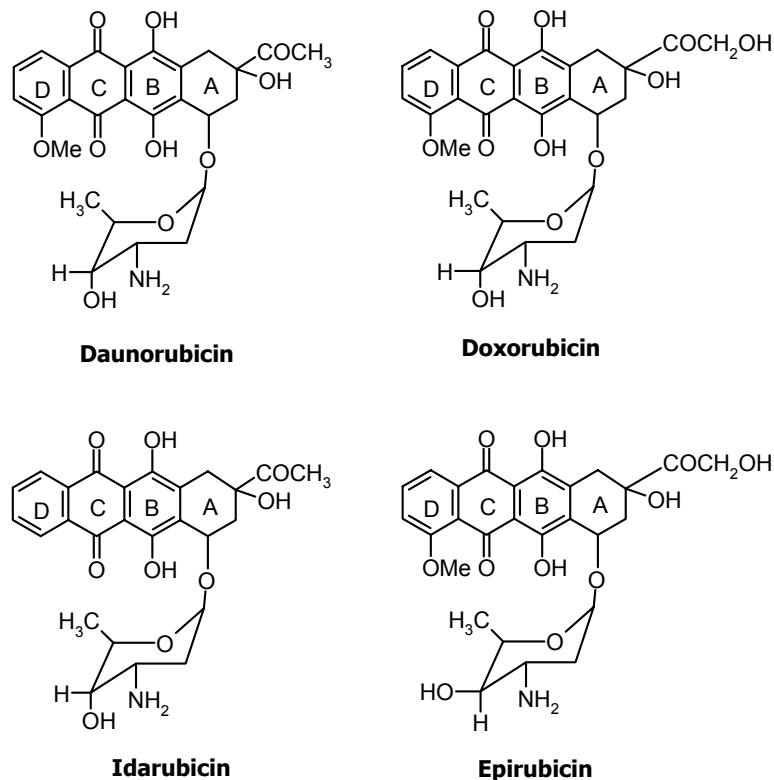


Abb. 3.2: Strukturformeln der wichtigsten Anthrazykline.

3.1.2.1 Idarubicin

Idarubicin (4-Demethoxydaunorubicin; s. Abb. 3.3) ist eines der bereits 1976 entwickelten Anthrazyklinderivate, welches immer mehr an Bedeutung gewinnt (Buckley *et al.*, 1997; Robert, 1993a). Es wird vor allem in der Therapie von Leukämien, Myelodysplasien, Non-Hodgkin Lymphomen und Mammakarzinomen verwendet (Goebel, 1992; Hollingshead *et al.*, 1991).

Idarubicin unterscheidet sich von der Muttersubstanz Daunorubicin durch die Substitution der C-4-Methoxy-Gruppe im D-Ring des Aglykons durch Wasserstoff (Adria Laboratories, 1990; Goebel, 1992). Diese geringfügige Veränderung des Moleküls hatte signifikante Konsequenzen für die pharmakokinetischen Eigenschaften, die Bioverfügbarkeit und die Toxizität.

Idarubicin zeichnet sich gegenüber den anderen Anthrazyklinen vor allem durch eine erhöhte Lipophilie aus (Borchmann *et al.*, 1997). Dies verbessert die Absorption durch die gastrointestinale Mukosa (Buckley *et al.*, 1997; Cerosimo, 1992), ebenso wird eine wesentlich schnellere Aufnahme in die Tumorzellen (Robert *et al.*, 1990; Speth *et al.*, 1986), sowie Liquorgängigkeit (Reid *et al.*, 1990, Adria Laboratories, 1990) ermöglicht. Des Weiteren wird der C-13-Alkohol-Metabolit Idarubicinol sowohl durch Metabolisierung in der Leber (Abb. 3.3), als auch ubiquitär durch Aldoketoreduktasen, in hohen Konzentrationen gebildet und zeigt die gleiche zytotoxische Aktivität wie die Muttersubstanz (Cerosimo, 1992; Fukushima *et al.*, 1994). Außerdem zeigten sich für Idarubicin und seinen Metaboliten *in vitro* und in klinischen Versuchen eine größere antitumorale Aktivität (Cerosimo, 1992;) sowie eine geringere Kardiotoxizität (Cerosimo, 1992; Goebel, 1992; Platel *et al.*, 1999) als für Daunorubicin.

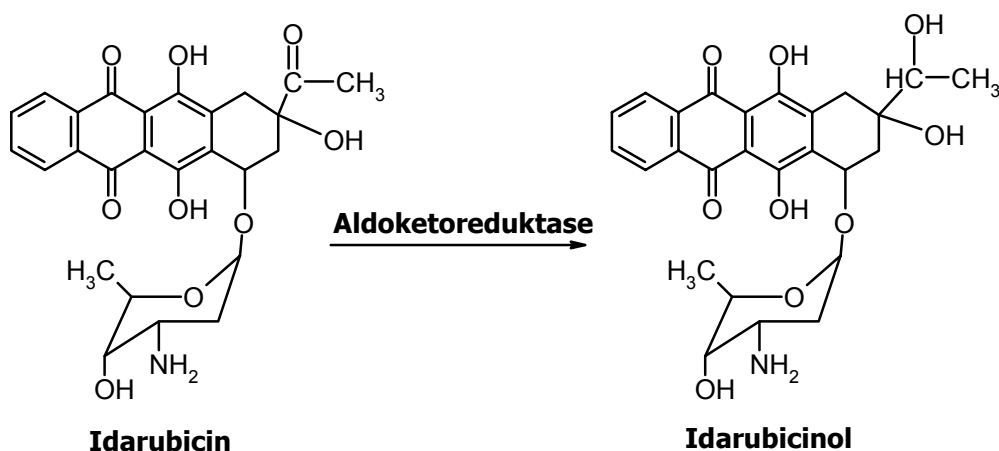


Abb. 3.3: Metabolismus von Idarubicin.

3.1.2.1.1 Pharmakokinetik von Idarubicin

Idarubicin wird nach oraler Gabe im Gastrointestinaltrakt schnell resorbiert, ist nach 30 Minuten im Plasma nachweisbar und erreicht Spitzenspiegel nach ca. 2 - 4 Stunden (Hollingshead *et al.*, 1991; Stewart *et al.* 1991). Die Bioverfügbarkeit wird mit 30% angegeben (Gillies *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1987). Für Idarubicin finden sich im Mittel maximale Plasmakonzentrationen von 3 ng/ml, für den Metaboliten Idarubicinol dagegen von 20 ng/ml (Eksborg *et al.*, 1990). Der hohe Plasma-Anteil des Metaboliten spiegelt den First-Pass-Metabolismus wieder (Buckley *et al.*, 1997). Die mittlere Halbwertszeit für Idarubicin liegt bei 15 Stunden (Speth *et al.*, 1989), für Idarubicinol bei 60 Stunden (Pannutti *et al.*, 1986; Stewart *et al.*, 1991).

Nach *intravenöser* Administration von Idarubicin werden im Mittel maximale Plasmakonzentrationen von 189 ng/ml und für Idarubicinol von 8 ng/ml erreicht (Eksborg *et al.*, 1990). Die mittlere Halbwertszeit von Idarubicin beträgt 22 Stunden, die von Idarubicinol sogar über 45 Stunden. Das Dispositionsprofil zeigt eine rasche Verteilungsphase, vermutlich auf Grund der extensiven Gewebefindung. Die mittlere Plasmaproteinbindung, *in vitro* ermittelt mit der Gleichgewichtsdialyse, beträgt für *in vivo* erreichbare Idarubicin Konzentrationen 97% und für Idarubicinol 94%, die Bindung ist konzentrationsunabhängig. Die Plasmaclearance ist durch einen extensiven hepatischen Metabolismus charakterisiert. Die Elimination findet vorwiegend biliär und zu einem geringeren Anteil renal, hauptsächlich in Form des primären Metaboliten Idarubicinol und anderen polareren Metaboliten, statt (Zini *et al.*, 1986; Adria Laboratories, 1990).

3.1.2.2 Wirkmechanismen der Anthrazykline

Für den Wirkungsmechanismus der Anthrazykline werden vier Modelle postuliert. Der Hauptwirkungsmechanismus ist die Beeinflussung der DNA- und RNA-Synthese durch Interkalation der Anthrazykline. Weitere Wirkungsmechanismen die diskutiert werden sind die Bildung freier Radikale, eine direkte Membranwirkung sowie die Chelatbildung mit Metallionen.

Der zytotoxische Effekt wird vor allem über die Interkalierung der DNA und die Induktion von DNA-Doppelstrang-Brüchen durch Inhibition der Topoisomerase II erreicht (Gieseler *et al.*, 1994). Abb. 3.4 zeigt den schematischen Idarubicin-DNA-Komplex bei der Interkalation in die DNA. Das Modell zeigt die Bedeutung der Zuckeraminogruppe für die Komplexbildung. Dieser wird über eine Methylengruppe

(* s. Abb. 3.4) stabilisiert, deren Herkunft noch nicht geklärt ist.

Die DNA-Bindungsaffinität von Idarubicin, die Fähigkeit diese zu interkalieren und die Topoisomerase II zu inhibieren sind etwas besser als die von Daunorubicin oder Doxorubicin (Fukushima *et al.*, 1993). Die erhöhte *in vitro*-Zytotoxizität und *in vivo* antitumorale Aktivität von Idarubicin wird unter anderem auf die erhöhte Lipophilie und DNA-Bindungskapazität zurückgeführt (Gieseler *et al.*, 1994).

Die direkte Membrantoxizität und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch Idarubicin sind dagegen dosisabhängige Effekte und vermutlich für die Nebenwirkungen der Chemotherapie, vor allem der Kardiotoxizität, verantwortlich (Gieseler *et al.*, 1995).

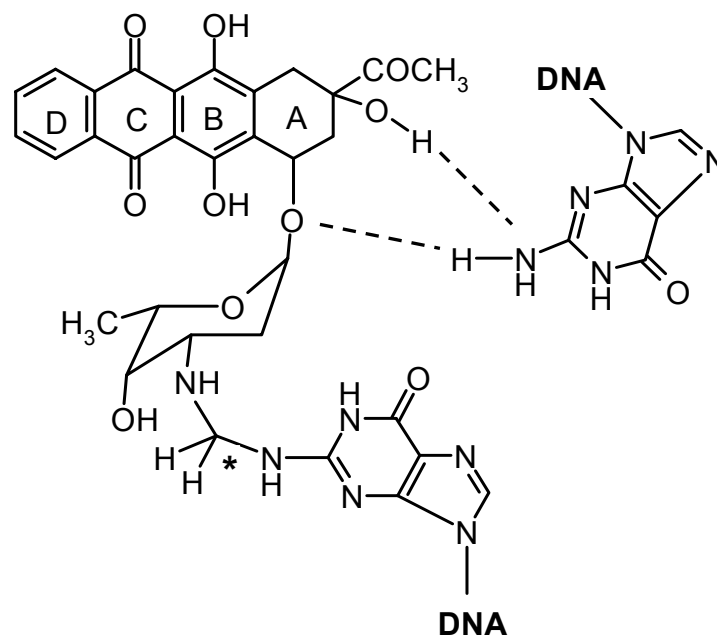


Abb. 3.4: Schematischer Idarubicin-DNA-Komplex. (Quelle: modifiziert nach Zeman *et al.*, 1995).

3.1.2.3 Toxizität

Neben den üblichen Nebenwirkungen von Zytostatikamedikamenten (Übelkeit und Erbrechen, Durchfall, Haarausfall u.a.) führen Anthrazykline zu einer ausgeprägten Knochenmarkssuppression. Lang andauernde Anthrazyklinverabreichungen können zu hämolytischen Anämien führen, die auf der Bildung freier Radikale bei gleichzeitig vermindertem Glutathiongehalt der Erythrozyten beruhen (Amitai *et al.*, 1996).

Doch insbesondere die Kardiotoxizität der Anthrazyklintherapie ist ein großes klinisches Problem (Unverferth *et al.*, 1982; Rhoden *et al.*, 1993). Die kardiotoxischen Nebenwirkungen der Anthrazykline können in einen akuten und einen chronischen

Typ unterteilt werden. Während der Anthrazyklininjektion treten häufig passagere Rhythmusstörungen ohne wesentliche klinische Relevanz auf.

Aus klinischer Sicht sind die Späteffekte der Anthrazyklintherapie von großer Bedeutung. Das Auftreten einer Kardiomyopathie ist von der verabreichten Anthrazyklingsamtdosis abhängig. Sie ist die Folge einer medikamentösbedingten Myozytenschädigung. Als Risikofaktoren, die das Auftreten einer Kardiomyopathie begünstigen, werden ein Alter über 70 Jahre und vorbestehende Herzerkrankungen, wie abgelaufener Myokardinfarkt oder langjähriger, therapierefraktärer Hypertonus, angesehen. Die Anthrazyklin-Kardiomyopathie wird mit den 13-Hydroxymetaboliten, namentlich Daunorubicinol, Doxorubicinol und Idarubicinol (Olson *et al.*, 1990; Cusack *et al.*, 1993) und der Entstehung von freien Radikalen (Olson *et al.*, 1981) in Zusammenhang gebracht.

3.1.2.4 Prävention Anthrazyklin-induzierter Kardiotoxizität

Aufgrund der Kardiotoxizität müssen häufig erfolgversprechende Therapieansätze mit Anthrazyklinen aufgegeben werden. Es lag deshalb nahe, Substanzen oder Applikationsformen zu suchen, die einen kardioprotektiven Effekt haben und die die therapeutische Breite und Effektivität der Anthrazykline erhöhen (Bielenberg, 2001). Einige Ansätze sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Zunächst boten sich Radikalfänger, sogenannte Scavenger wie α -Tocopherole oder *N*-Acetylcystein als Sulfhydryl-Gruppen-Donator an. Doch weder Vitamin E noch *N*-Acetylcystein erwiesen sich hier als erfolgreich. Bei der Suche nach neuen Scavengern musste beachtet werden, dass die Wirkung der Anthrazykline nicht antagonisiert werden darf. Das Aminothiold Amifostin kann *in vitro* als Scavenger von Superoxidionen und Hydroxylradikalen fungieren. *In vivo* kann es die Letalität hoher Dosen von Doxorubicin senken, ohne die zytotoxische Potenz zu beeinflussen (Wouters *et al.*, 2005).

Gute Ergebnisse liegen beim Dexrazoxan vor, einem bis-Piperazindion, das nach Hydrolyse ein Chelatring-bildendes Substrat, ähnlich dem EDTA, bildet. Der kardioprotektive Effekt wird auf dieses Hydrolyseprodukt zurückgeführt, indem es freies Eisen oder Anthrazyklin-gebundenes Eisen komplexiert und so die Eisenvermittelte Sauerstoffradikalbildung unterbindet (Minotti *et al.*, 2004).

Eine weitere Möglichkeit, die Kardiotoxizität von Anthrazyklinen zu reduzieren, ist die Vermeidung hoher Plasmakonzentrationen im gesunden Gewebe durch eine verbesserte Galenik. Liposomal verkapselte Anthrazykline werden durch Lücken im Tumorgewebe aufgenommen, die Liposomenmembran abgebaut und der Wirkstoff

freigesetzt (Minotti *et al.*, 2004).

Auch spezielle Applikationsformen wie kontinuierliche Infusionen und wöchentliche Bolus-Injektionen wurden in diesem Zusammenhang untersucht. Die Verlängerung der Infusionsdauer soll dabei hohe Plasmakonzentrationen vermeiden, die direkt mit der Kardiotoxizität in Verbindung gebracht werden (Paul *et al.*, 1989). In einigen Studien (Legha *et al.*, 1982; Shapira *et al.*, 1990) konnte gezeigt werden, dass die Verlängerung der Infusionsdauer zu einer Verminderung der Kardiotoxizität führte. In anderen Studien dagegen wurden keine Verbesserungen gefunden (Eksborg *et al.*, 1997).

3.1.3 Zielsetzung und Fragestellungen

Anthrazykline gehören zu den am häufigsten verwendeten und wichtigsten Chemotherapeutika bei der Behandlung unterschiedlicher Tumore. Insbesondere bei der Behandlung der akuten Leukämie stellen sie einen wesentlichen Eckpfeiler der Therapie dar.

Eine der ernst zu nehmenden Nebenwirkungen ist die Kardiotoxizität. Das Risiko einer Kardiotoxizität steigt in den meisten Fällen mit der verabreichten Dosis (Goebel *et al.*, 1992). In der Regel werden Anthrazykline als kurze *i.v.*-Infusion appliziert. Ein hoher Plasma-Peak, der generell nach einer kurzen Infusionszeit auftritt, scheint direkt mit der Kardiotoxizität zu korrelieren, was für eine Verlängerung der Applikationsdauer sprechen würde. Auf der anderen Seite werden ausreichend hohe Plasma-Spiegel und eine hohe AUC zum Einleiten der Apoptose benötigt (Gieseler *et al.*, 2000). Ein Anstieg der AUC, insbesondere in den leukämischen Zellen, durch Verlängerung der Infusionsdauer, könnte die therapeutische Effizienz des Anthrazyklins verbessern. Der zytotoxische Effekt ist dabei auch abhängig von der Aufnahme des Anthrazyklins durch die Leukämiezellen. Wichtig für die Aufnahme sind damit die Konzentration des Zytostatikums im Extrazellulärraum und die Plasmaprotein-Bindung. Idarubicin hat eine hohe Plasmaprotein-Bindung und wie in einer früheren Untersuchung von Kessel *et al.* (1999) festgestellt werden konnte, spielt diese eine wichtige Rolle für die Aufnahme des Idarubicins in die Zellen.

Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob sich die Verlängerung der Infusionsdauer von 30 auf 180 Minuten auf die *extrazelluläre* und im Besonderen auf die *intrazelluläre* Idarubicin-Pharmakokinetik auswirkt. Primäres Ziel sollte dabei sein, zu prüfen, ob es eine pharmakokinetische Begründung für die oftmals in der klinischen Praxis eingesetzten, verlängerten Infusionszeiten gibt und ob die Therapie anhand der erhaltenen pharmakokinetischen Parameter optimiert werden kann. Als

sekundäres Ziel sollte im Rahmen dieser Studie die Frage beantwortet werden, ob klinisch-chemische Faktoren, wie z.B. der Albumin-Spiegel als pharmakodynamische Parameter einen Einfluss auf die Idarubicin-Pharmakokinetik besitzen.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Material

Eine Aufstellung aller verwendeten Geräte und Chemikalien findet sich im Anhang dieser Arbeit.

3.2.2 Analytik von Idarubicin

3.2.2.1 Probenaufarbeitung

Für die Quantifizierung von Idarubicin und Idarubicinol in den untersuchten biologischen Matrices (Plasma, Zellen und Urin) wurden folgende bioanalytische Methoden ausgewählt.

Aufbereitung der Plasmaproben

Die Aufarbeitung der Plasmaproben mittels Plasmaproteinfällung wurde nach der von von Kuhlmann *et al.* (1999) entwickelten Methode mit einigen Veränderungen durchgeführt:

Die bei -80 °C gelagerten Plasmaproben wurden für 5 Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. 500 µl des Plasmas wurden in 500 µl einer eiskalten Mischung Methanol/Acetonitril/85% o-Phosphorsäure (49.7:49.7:0.6) pipettiert und für 20 Sekunden geschüttelt. Die Proben wurden dann bei -20 °C eingefroren, um das gefällte Protein nach dem Einfrieren besser abtrennen zu können. Nach mindestens 12 Stunden wurden die Plasmaproben für 5 Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und bei 8000 *g* 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der HPLC-Analytik zugeführt (Kap. 3.2.2.2).

Aufbereitung der Zellproben

Die Aufarbeitung der peripheren mononukleären Blutzellen erfolgte mittels Zelllyse in Anlehnung an die von Gieseler *et al.* (1994) entwickelte Methode.

Die bei -80 °C eingefrorenen Zellproben wurden für 5 Minuten im Wasserbad bei 42 °C aufgetaut. Anschließend wurden sie für 2 Minuten bei 500 *g* zentrifugiert. Die Überstände wurden daraufhin vorsichtig, möglichst quantitativ, abpipettiert. Die weitere Aufarbeitung der Überstände erfolgte analog zu den Plasmaproben.

Zur Bestimmung der intrazellulären Idarubicin- und Idarubicinol-Konzentrationen wurden die abzentrifugierten Zellen durch Zugabe von 200 µl Isopropanol/12 N Salzsäure (96.7:3.3) und 5-minütiges Schütteln lysiert. Das resultierende Zelllysate wurde mit 200 µl Phosphatpuffer (500 mM, pH 3.0) versetzt und nochmals für 2 Minuten geschüttelt. Die Proben wurden danach für mindestens 12 Stunden bei -20 °C eingefroren. Zur weiteren Aufarbeitung wurden sie für 2 Minuten bei 42 °C im Wasserbad aufgetaut und danach bei 8000 *g* für 10 Minuten zentrifugiert. Die erhaltenen klaren Überstände wurden abgenommen und der HPLC-Analytik zugeführt (Kap. 3.2.2.2).

Aufbereitung der Urinproben mittels Festphasen-Extraktion

Die Aufbereitung der Urinproben mittels Festphasenextraktion erfolgte in Anlehnung an das von Sottani *et al.* (2004) entwickelte Verfahren.

Für die Isolierung des Idarubicins und des Idarubicinols aus dem Urin wurden SPE-Kartuschen (Strata-X[®], 30 mg/ml) der Firma Phenomenex verwendet. Jeweils 1 ml Urin wurde mit 0.5 ml Phosphatpuffer, pH 7.0 (Kap. 5.2.2) versetzt und auf dem Schüttler gut gemischt. Alle Urinproben wurden somit auf einen einheitlichen pH-Wert von 7.0 eingestellt.

Vor dem Auftragen der Probe auf die SPE-Säule wurde diese mit 1 ml Methanol konditioniert und anschließend mit 1 ml *Aqua bidest.* equilibriert. Die Flussrate für beide Schritte betrug 3 ml/min. Danach wurde die vorbereitete Urinprobe aufgetragen und mit einem Fluss 1 ml/min durch die Bettmasse gesogen. Zur Entfernung von Matrixbestandteilen wurde die Säule zweimal mit je 500 µl Phosphatpuffer, pH 7.0 (Kap. 5.2.2) gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit Hilfe einer Vakuumpumpe getrocknet. Die beiden Analyten wurden im folgenden Schritt mit 1 ml Isopropanol/Dichlormethan 50:50 (v/v) eluiert und unter Stickstoffstrahl bis zur Trockene evaporiert. Der Rückstand wurde in 250 µl mobiler Phase (Kap. 3.2.2.2) aufgenommen und der HPLC-Analytik zugeführt.

3.2.2.2 HPLC-Analytik

Die Quantifizierung von Idarubicin und Idarubicinol wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels HPLC-Analytik durchgeführt. Dabei wurde die von Kuhlmann *et al.* (1999) entwickelte Methode in modifizierter Form angewandt.

HPLC-System:	Waters™ 600 Pumpe, Autosampler Waters™ 717 plus, Waters™ 474 Scanning Fluorescence Detector, Waters™ 600 Controller, Integrator EZChrom™ Elite Software, Version 2.8.3 (Scientific Software Inc., San Ramon, CA)		
Stationäre Phase:	LiChrocart® Superspher 60 RP-select B column, 125 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Fa. Merck, LiChrocart® LiChrospher® 60 RP-select B guard column, 4 mm x 4 mm		
Säulentemperatur:	40 °C		
Mobile Phase:	20 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer in <i>Aqua bidest.</i> , pH 3.0 (eingestellt mit konz. H ₃ PO ₄)/Acetonitril/Tetrahydrofuran 74:18:8 (v/v)		
Detektion:	Fluoreszenz:	Ex: 485 nm,	Em: 542 nm
Detektoreinstellungen:	Gain: 1000,	Attenuation: 64,	Resp.: 10 sec
Flussrate:	1 ml/min		
Injektionsvolumen:	50 µl		
Retentionszeiten:	Idarubicinol:	6.7 ± 0.2 min	
	Idarubicin:	9.7 ± 0.4 min	
Begasung:	5 ml/min		

Der Phosphatpuffer wurde filtriert (Porendurchmesser 0.45 µm) und zur Entfernung des Sauerstoffs nach Zugabe des Acetonitrils und des Tetrahydrofurans in einem Ultraschallbad für 15 Minuten entgast.

3.2.2.3 Kalibrierung

Für die Bestimmung der Idarubicin- und Idarubicinolkonzentrationen in Plasma-, Zell- und Urinproben wurde vor jeder Messung eine matrixadaptierte Kalibrierung durchgeführt.

Herstellung der Stamm- und Arbeitslösungen

Zur Durchführung einer quantitativen Bestimmung mussten zunächst Stamm- und Arbeitslösungen der beiden zu untersuchenden Substanzen hergestellt werden. Die Stammlösungen von Idarubicin bzw. Idarubicinol wurden durch Verdünnen der Reinsubstanzen mit DMSO in einer Konzentration von jeweils 1 mg/ml hergestellt. Die erhaltenen Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Ausgehend von den beiden angefertigten Stammlösungen wurden zwei sogenannte Spikelösungen hergestellt, die sowohl Idarubicin als auch Idarubicinol in einer Konzentration von jeweils 20 000 ng/ml (SP-1) und 10 000 ng/ml (SP-2) enthielten. Aus diesen Spikelösungen wurden dann die benötigten Arbeitslösungen mit den Konzentrationen 5 000, 1 000, 500, 100 und 50 ng/ml (AL-1 bis AL-5) durch Verdünnen mit DMSO hergestellt. Auch diese Lösungen wurden aliquotiert und bei -24 °C gelagert. Bei allen Lösungen wurde auf einen ausreichenden Lichtschutz geachtet.

Herstellung der Kalibratorlösungen

Für die matrixadaptierte Kalibrierung wurde der jeweilige Kalibrator aus der entsprechenden Arbeitslösung und analytenfreier Matrix nach folgenden Pipettierschemen hergestellt (Tab. 3.2 [a] - [c]). Die Aufarbeitung der leeren Matrices Plasma, Zellen und Urin, die von gesunden Probanden gewonnen wurden, entsprach der in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Probenaufarbeitung.

Die Kalibratorreihe wurde mittels HPLC (Kap. 3.2.2.2) quantifiziert. Aus den bei der Mehrfachbestimmung (n = 6) erhaltenen Mittelwerten wurden mittels linearer Regression für jeden Analyten und für jede Matrix eine Kalibriergerade erstellt, die zur Berechnung der Idarubicin- und Idarubicinol-Konzentrationen der vermessenen Proben dienen.

Tab. 3.2: Herstellung der Kalibratoren für die quantitative Bestimmung von Idarubicin und Idarubicinol.

[a] Plasma

Kalibrator	Konzentration Ida/Idaol in Plasma [ng/ml]	Plasma [μl]	Arbeits- oder Spikelösung [μl]	Verwandte Lösung
1	0.5	490	10	AL-5
2	1	490	10	AL-4
3	5	450	50	AL-4
4	10	400	100	AL-4
5	50	450	50	AL-2
6	100	400	100	AL-2
7	250	475	25	SP-2

[b] Zellen

Kalibrator	Konzentration Ida/Idaol in Zellen [ng/ml]	Zellen [μl]	Arbeits- oder Spikelösung [μl]	Verwandte Lösung
1	1	490	10	AL-4
2	5	490	10	AL-3
3	10	490	10	AL-2
4	50	490	10	AL-1
5	100	490	10	SP-2
6	200	490	10	SP-1

[c] Urin

Kalibrator	Konzentration Ida/Idaol in Urin [ng/ml]	Urin [μ l]	Arbeits- oder Spikelösung [μ l]	Verwandte Lösung
1	10	990	10	AL-2
2	50	950	50	AL-2
3	100	900	100	AL-2
4	250	975	25	SP-2
5	500	950	50	SP-2
6	1000	900	100	SP-2

3.2.3 Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Idarubicin und Idarubicinol

3.2.3.1 Studiendesign

Dieser Arbeit liegt eine offene multizentrische Phase-IV-Studie zur Untersuchung der *extra*- und *intrazellulären* Pharmakokinetik des Idarubicins und seines Metaboliten Idarubicinol unter besonderer Berücksichtigung der Infusionsdauer zugrunde, in deren Rahmen 33 Patienten teilgenommen haben. Die Studie wurde nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission gemäß den Richtlinien der Good Clinical Practice durchgeführt. Die teilnehmenden Patienten wurden durch die studienbetreuenden Ärzte schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

Die klinisch-pharmazeutischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit der „North Italian Leukemia Study Group“ durchgeführt. Die Blutproben der Patienten wurden in den verschiedenen teilnehmenden onkologischen Zentren in Italien gesammelt und zur Bearbeitung auf Stickstoff nach Deutschland geschickt.

3.2.3.2 Patientenkollektiv

Die Patienten, die an der Studie teilnahmen, litten entweder unter akuter myeloischer oder unter akuter lymphatischer Leukämie. Es handelte sich dabei im speziellen um

Patienten, die während der Induktionstherapie nach dem sogenannten ICE-Protokoll, einem Standardprotokoll, bestehend aus 12 mg/m² Idarubicin (Tag 1, 3 und 5), 100 mg/m² Cytosin-Arabinosid (Tag 1 - 7) und 100 mg/m² Etoposid (Tag 1 - 3) behandelt worden sind und die auf diese Behandlung hin keine komplette Remission erreicht hatten (Kap. 3.2.4.3).

Es mussten Einschlusskriterien, wie Alter zwischen 18 und 70 Jahren, einen ECOG- (Eastern Cooperative Oncology Group)-Performance Status von 0, 1 oder 2 und eine durch entsprechende Laboruntersuchungen dokumentierte Leber- und Nierenfunktion erfüllt werden. Die Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tab. 3.3: Charakteristika der rekrutierten Patienten.

Patient [Abk.]	Ge- schlecht [F/M]	Alter [Jahre]	KOF [m²] (x)	Albumin [g/dl]	Creatinin- Clearance [l/h]	Response (+)	Befund (+)	Infusions- Dauer [min]
BG-02	F	45	1.78	3.21	3.17	CR	AML	30
BG-05	M	39	1.90	4.50	4.30	CR	AML	30
BG-06	F	37	1.51	4.20	2.73	CR	AML	30
BG-10	M	29	1.99	3.90	7.33	CR	ALL	30
BG-14	F	49	1.75	3.90	4.88	CR	AML	30
BG-17	F	41	1.65	3.02	3.30	NR	AML	30
BG-19	F	23	1.77	2.93	4.91	CR	AML	30
BG-23	F	19	1.45	3.68	2.81	NR	ALL	30
BG-24	M	43	2.03	3.97	7.38	CR	AML	30
BG-25	F	42	1.26	3.81	1.89	PR	AML	30
BG-26	M	58	1.76	3.11	3.28	NR	AML	30
BG-29	F	30	1.69	3.84	3.73	ED	AML	30
BG-30	F	24	1.29	3.86	1.75	ED	AML	30
BG-32	M	20	1.67	4.34	3.88	ED	ALL	30
BG-34	M	36	2.15	3.5	7.57	CR	AML	30

Patient [Abk.]	Ge- schlecht [F/M]	Alter [Jahre]	KOF [m²] (x)	Albumin [g/dl]	Creatinin- Clearance [l/h]	Response (*)	Befund (†)	Infusions- Dauer [min]
BG-01	M	51	1.94	k.A.	6.08	CR	AML	180
BG-03	M	60	1.92	k.A.	4.62	ED	AML	180
BG-07	M	k.A.	k.A.	3.54	k.A.	CR	ALL	180
BG-09	F	39	1.96	3.20	5.74	ED	ALL	180
BG-11	F	33	1.97	3.60	4.65	ED	AML	180
BZ-01	M	48	1.71	3.70	4.81	NR	AML	180
BG-13	M	26	1.92	3.61	6.46	CR	ALL	180
BG-15	M	48	1.76	4.30	4.94	NR	AML	180
BG-16	F	25	1.59	4.10	2.68	NR	ALL	180
BG-18	M	31	2.09	3.26	6.95	CR	AML	180
BG-20	M	33	1.91	4.08	5.42	CR	ALL	180
BG-21	M	52	1.82	3.94	3.71	ED	ALL	180
BG-22	F	61	1.63	2.86	2.54	CR	AML	180
BG-27	M	40	2.25	k.A.	7.40	PR	AML	180
BG-28	M	45	1.96	4.43	4.78	CR	AML	180
BG-31	F	47	1.66	4.01	2.80	NR	AML	180
BG-33	M	19	1.76	4.24	4.16	CR	AML	180
BG-35	M	67	1.86	3.04	3.65	ED	AML	180

* Körperoberfläche nach Dubois & Dubois (1916); *CR - Komplete Remission, NR - Non-Responder, PR – Partielle Remission, ED - Early Death; †AML - Akute Myeloische Leukämie, ALL - Akute Lymphatische Leukämie; k.A. – keine Angaben

3.2.3.3 Therapieplan und Studiendesign

Die Patienten wurden mit Idarubicin in einer Dosierung von 17.5 mg/m² Körperoberfläche an Tag 1 und 8 des jeweiligen Therapiezyklus behandelt. Zusätzlich erhielten sie Cytosin-Arabinosid (Ara-C) in einer Dosis von 2 x 3 g/m² an Tag 2, 3, 9 und 10 und eine auf die jeweilige Therapie abgestimmte Supportivtherapie, z.B. intravenöse Hydratation und Nausea- und Emesis-Prophylaxe.

Es wurden zwei Gruppen bestehend aus 15 und 18 Patienten gebildet; die erste Gruppe bekam Idarubicin als 30-minütige Infusion, der zweiten Gruppe wurde es über 180 Minuten appliziert.

3.2.3.4 Probenentnahmen

Den Patienten wurden in einem Behandlungszyklus jeweils drei Blutproben mit einem Volumen von je 15 ml entnommen und aufgearbeitet. Diese Proben dienten zur Untersuchung der Idarubicin-Pharmakokinetik im Plasma und in den Zellen (je 7.5 ml) und wurden unmittelbar vor Infusionsbeginn und 3 und 24 Stunden nach Start der Idarubicin-Infusion entnommen.

Des Weiteren wurde der 24-h-Urin von 10 Patienten (je fünf Patienten pro Infusionsdauer; s. Kap. 3.2.3.3) für die Evaluierung der renalen Clearance des Idarubicins und des Idarubicinols gewonnen.

3.2.3.5 Probengewinnung, -aufarbeitung und -lagerung

Die Blutabnahmen wurden in allen onkologischen Zentren aus einem peripheren Zugang vorgenommen (i. d. Regel *Vena mediana cubiti*), um eine Kontamination der Proben mit Idarubicin direkt aus der Infusion zu vermeiden. Zur Abnahme wurden Röhrchen mit Li-Heparin als Antikoagulanzen verwendet. Alle Blutproben wurden direkt nach der Abnahme aufgearbeitet um Umverteilungsvorgänge zwischen verschiedenen Blutbestandteilen und das Fortschreiten der Proteinbindung zu unterbinden. Die zur Aufarbeitung erforderlichen Zentrifugationsschritte wurden aus demselben Grund bei 4 °C durchgeführt.

Das zur Bestimmung der *extrazellulären* Pharmakokinetik benötigte Plasma wurde durch Zentrifugation der Röhrchen (10 min, 1500 g, 4 °C) erhalten. Es wurden 3 x 1 ml des gewonnenen Plasmas in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

Die peripheren mononukleären Blutzellen zur Bestimmung der intrazellulären Pharmakokinetik wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aus dem gewonnenen Blut der Patienten isoliert (Boyum, 1968).

Dazu wurden in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen 3 ml Histopaque[®]-1077 vorgelegt und auf Raumtemperatur konditioniert. Das Histopaque[®]-1077 wurde mit der gleichen Menge heparinisierendem Frischblut vorsichtig mit einer Pipette - ohne Vermischung der Grenzschichten - überschichtet. Zur Ausbildung eines Dichtegradienten wurde das Röhrchen bei 20 °C, einer Umdrehungszahl von 480 *g* und einem mäßigen Auslauf ohne Bremse 20 Minuten lang zentrifugiert. An der ursprünglichen Grenzschicht zwischen Histopaque[®] und Blut wurde, nach erfolgter Zentrifugation, ein weißer Ring sichtbar. Bei dieser so genannten Interphase handelte es sich um eine Schicht, bestehend aus angereicherten mononukleären Blutzellen, wie beispielsweise B- und T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und mononukleären Vorläuferzellen. Während der Überstand oberhalb des Zellrings verworfen wurde, wurde der eigentliche Interphase-Ring abpipettiert und in ein steriles 15 ml Plastikröhrchen überführt, welches anschließend mit Phosphatpuffer, pH 7.0 (Kap. 5.2.2) ad 15 ml aufgefüllt wurde. Die Zellen wurden abermals abzentrifugiert (20 °C, 250 *g*, 10 min, Auslauf mit Bremse). Das Zellsediment wurde anschließend erneut in 15 ml Phosphatpuffer, pH 7.0 resuspendiert und erneut gewaschen. Zum Schluss wurde das Zellpellet in 1 ml RPMI-1640-Medium mit 10% DMSO resuspendiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Zählkammer nach Neubauer (Neubauer Improved Assistent Bright Line, Germany; Gesamtfläche: 0.025 mm², Tiefe 0.1 mm, 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten). Die Zellsuspensionen wurden hierzu mit Trypanblau (*trypan blue solution* 0.4%) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Da einige Zellen nach dem Zelltod in der Regel ihre zuvor intakte Membranbarriere verlieren, können sie mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau angefärbt werden. Tote Zellen erschienen in diesen Fällen bei mikroskopischer Betrachtung als schwarz-blaue, unregelmäßig begrenzte Punkte. Mit Hilfe eines Mikroskops konnten folglich alle vitalen Zellen in je vier Großquadraten ausgezählt werden. Die Zählung umfasste dabei mindestens 200 Zellen. Anschließend wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Der Urin zur Untersuchung der renalen Clearance wurde über 24 Stunden in Polyethylen-Flaschen gesammelt. Die totalen Volumina wurden notiert und der Urin in 10 ml Aliquots bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.4 Klinische Dokumentation

3.2.4.1 Demographische Daten

Um den Einfluss individueller Faktoren auf die untersuchten Parameter charakterisieren zu können, wurden bei allen Patienten das Alter, die Körpergröße, das Körpergewicht, die Körperoberfläche und das Geschlecht dokumentiert. Außerdem wurden die vorliegende Erkrankung, die Patientenhistorie und dort v.a. das Ausmaß der Vorbehandlung aufgenommen.

3.2.4.2 Laborparameter

Im Verlauf der Therapie wurde bei den Patienten eine Reihe von Laborwerten routinemäßig überwacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Parameter dokumentiert:

- Hämoglobin [g/dl], Leukozytenzahl [$\times 10^9/l$], Granulozytenzahl [$\times 10^9/l$] und Thrombozytenzahl [$\times 10^9/l$]
- Hämatokrit [%]
- Serumkreatininkonzentration [mg/dl]
- Albumin [g/dl].

3.2.4.3 Tumoransprechen

Die Beurteilung des Ansprechens auf die verabreichte Therapie wurde durch die behandelnden Onkologen in der Regel nach 11 und 28 Tagen durch eine Knochenmark-Biopsie vorgenommen; die Bewertung erfolgte nach unten aufgeführten Kriterien, die sich an Parametern wie dem Ausmaß der Tumorrückbildung und der Remissionsdauer orientieren.

Folgende Kategorien wurden für diese Studie unterschieden:

- **Komplette Remission (CR):**

Die Knochenmark-Probe nach 28 Tagen zeigt weniger als 5% Blasten und eine normale Hämatopoese mit Hämoglobin > 9 g/dl, Thrombozyten $> 50 \times 10^9/L$ und Neutrophilen $> 1 \times 10^9/L$. Die Remissionsdauer beträgt mindestens 4 Wochen.

- **Partielle Remission (PR):**

Reduktion der Blasten im Knochenmark um mindestens 50%.

- **Non-Responder (NR):**

Kein oder nur ungenügendes Ansprechen auf die Therapie.

- **Early Death (ED):**

Tod des Patienten auf Grund von Komplikationen, noch bevor der Response untersucht wurde.

3.2.5 Pharmakokinetische Datenanalyse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die individuellen pharmakokinetischen Parameter für Idarubicin und Idarubicinol für jeden Patienten aus den erhaltenen Konzentrations-Zeit-Verläufen im Plasma und den Zellen berechnet.

Dabei wurden zunächst die erreichten Plasma- bzw. Zell-Konzentrationen ($C_{\max,3h}$) drei Stunden nach Infusionsbeginn abgelesen. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC_{3-24h}) wurde dann mit Hilfe der linearen Trapezregel bestimmt.

Für die Abschätzung der pharmakokinetischen Parameter wurde eine modellunabhängige Datenanalyse durchgeführt.

Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Excel[®] 2002 (Microsoft, 2002, SP3) durchgeführt.

3.2.5.1 Modellunabhängige Datenanalyse

Die Berechnung der renalen Clearance erfolgte nach folgender Formel:

$$CL_{renal} = \frac{U_t}{AUC_{0-t}}$$

U_t : Kumulative Arzneistoffmenge im Urin

Die renale Exkretion berechnete sich wie folgt:

$$E_{renal} [\%] = \frac{U_t}{Dosis} * 100$$

Die Berechnung der weiteren pharmakokinetischen Parameter ist bereits in

Kap. 2.2.6.1 aufgeführt.

3.2.6 Statistik

Die statistische Datenanalyse wurde mittels der Computerprogramme Excel[®] 2002 (Microsoft, 2002, SP3) und Statistica[®], Version 6.0 (StatSoft Inc., USA) für Windows betrieben.

3.2.6.1 Deskriptive Statistik

Die Formeln zur deskriptiven Statistik wurden in Kap. 2.2.7.1 behandelt.

3.2.6.2 Beschreibende Statistik

Die angewendeten Testverfahren wurden in Kap. 2.2.7.2 erläutert.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Quantifizierung von Idarubicin und Idarubicinol in biologischen Matrices

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Idarubicin und Idarubicinol in unterschiedlichen Matrices (Plasma, mononukleäre Blutzellen und Urin) quantifiziert werden. Jede Matrix hatte eine besondere Zusammensetzung und bedurfte somit einer speziellen Probenaufarbeitung. Dazu wurden die in der Literatur beschriebene Verfahren von Kuhlmann *et al.* (1999), Sottani *et al.* (2004) und Gieseler *et al.* (1994) modifiziert. Zur Quantifizierung von Idarubicin und Idarubicinol wurde die von Kuhlmann *et al.* (1999) entwickelte HPLC-Methode an die Aufgabenstellung dieser Arbeit angepasst sowie gemäß internationaler Richtlinien (FDA, 2001; Kromidas, 2000) validiert.

Kalibrierung

Zur Quantifizierung des Idarubicins und seines Metaboliten Idarubicinol wurde für jede Matrix eine matrixadaptierte Kalibrierung mit der unter Kapitel 3.2.2.2 beschriebenen HPLC-Analytik durchgeführt. Abbildung 3.5 zeigt die jeweils durch lineare Regression erhaltenen Ausgleichsgeraden der Kalibrierungen von Idarubicin und Idarubicinol in den drei Matrices Plasma, Zellen und Urin. Alle Funktionen der 6- bzw. 7-Punkt-Kalibrierungen waren innerhalb der untersuchten Konzentrationsbereiche linear. Die Korrelationskoeffizienten für beide Analyten betragen in jeder Matrix $r = 0.999$. Die Wiederfindungsraten für die einzelnen Matrices sind in Kapitel 3.3.2.4 aufgeführt.

Zur quantitativen Bestimmung niedrigerer Idarubicin und Idarubicinol-Konzentrationen (< 10 ng/ml) im Plasma und in den Zellen wurden jeweils die Gleichungen der resultierenden Regressionsgeraden der Kalibrierungen in dem Bereich von 1 - 10 ng/ml verwendet. Die Korrelationskoeffizienten betragen ebenfalls $r = 0.999$.

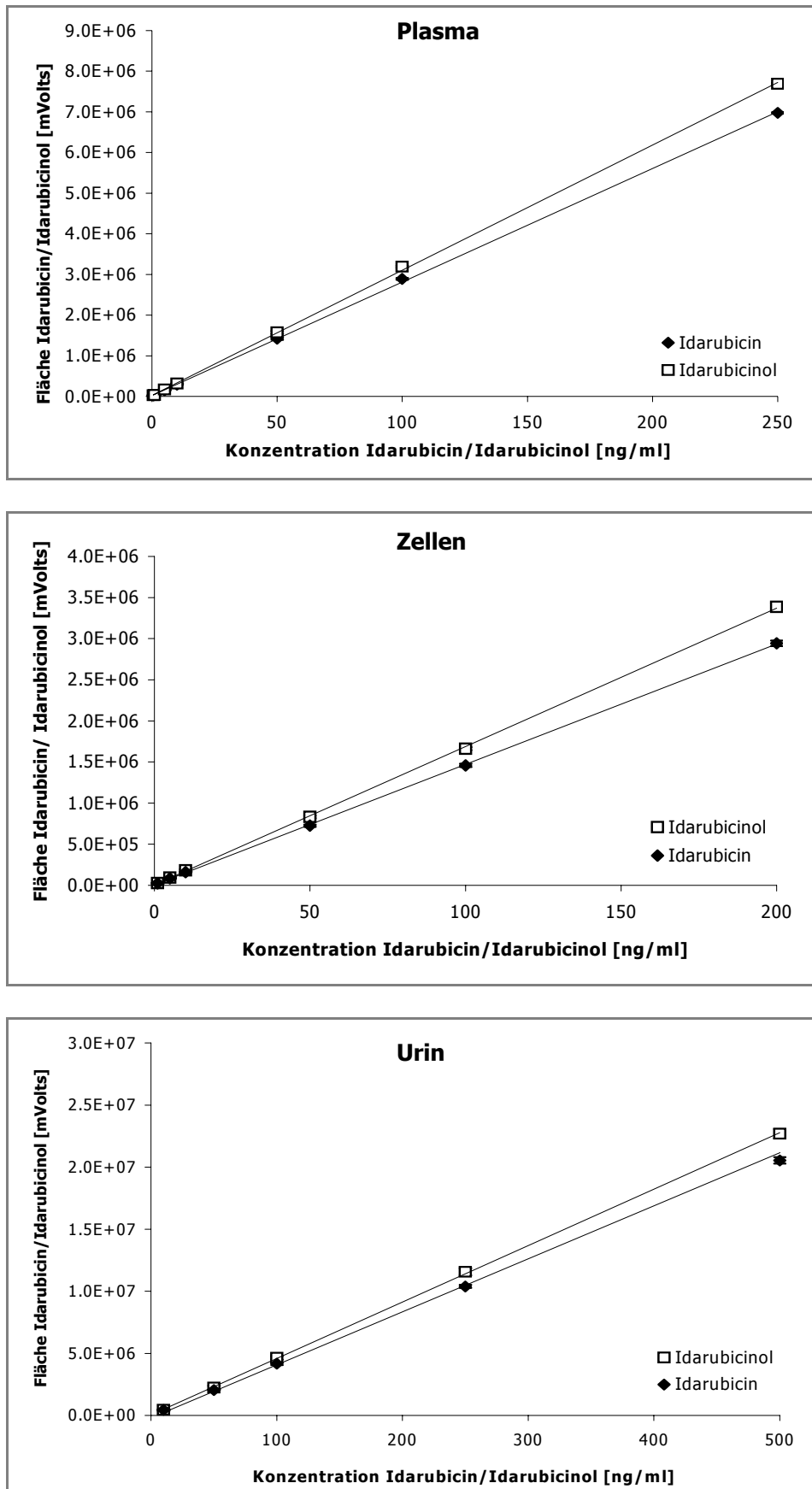


Abb. 3.5: Kalibrierung von Idarubicin und Idarubicinol in den untersuchten Matrices. Die Signalfächen sind die Mittelwerte \pm SD aus $n = 6$, jeweils doppelt vermessen.

Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte mittels Plasmaproteinfällung nach einer von Kuhlmann *et al.* (1999) entwickelten Methode mit Modifikationen.

In Abbildung 3.6 sind zwei typische HPLC-Chromatogramme dieser Probenaufarbeitung beispielhaft dargestellt.

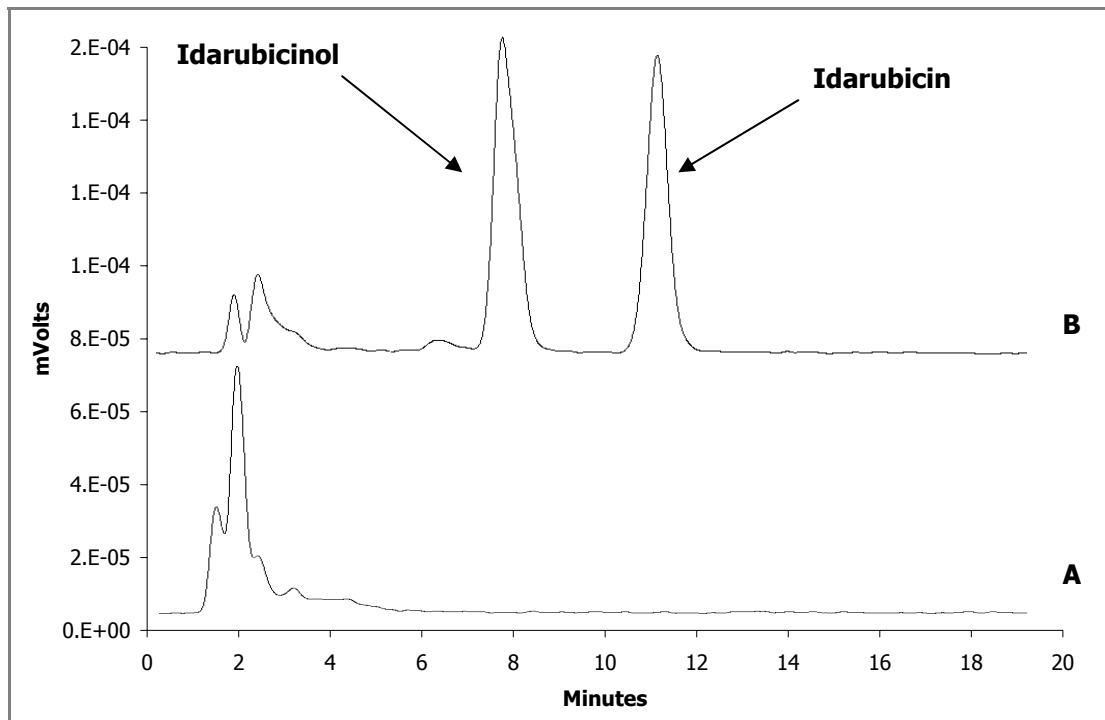


Abb. 3.6: Repräsentative HPLC-Chromatogramme von Idarubicin und Idarubicinol im Plasma einer Patientin. [A] Plasmaprobe vor der Infusion, [B] Plasmaprobe drei Stunden nach Start der 30-minütigen Infusion und einer Dosis von 17.5 mg/m^2 Idarubicin.

Aufbereitung der Zellproben

Die mononukleären Blutzellen wurden zur Bestimmung der intrazellulären Idarubicin- und Idarubicinol-Konzentrationen nach einer Methode von Gieseler *et al.* (1994) aufgearbeitet.

Dazu wurden die gelagerten Zellproben zunächst aufgetaut und vorsichtig zentrifugiert (s. Kap. 3.2.2.1), um das RPMI-1640-Zellmedium zu entfernen. Der Überstand wurde abpipettiert und nach weiterer Aufarbeitung der HPLC-Analytik zugeführt. Dieser Schritt war notwendig, um durch Umverteilungsvorgänge mit dem Zellmedium, intrazellulär verloren gegangenes Idarubicin bzw. Idarubicinol, mitbestimmen zu können. Abbildung 3.7 zeigt zwei repräsentative HPLC-Chromatogramme dieser Probenaufarbeitung.

Konnte im Chromatogramm des Überstandes noch ein Peak zur Retentionszeit des Idarubicins oder Idarubicinols detektiert werden, wurde die entsprechende Konzentration mit Hilfe der bei der Kalibrierung ermittelten Regressionsgeraden berechnet und mit der intrazellulär gemessenen Konzentration addiert.

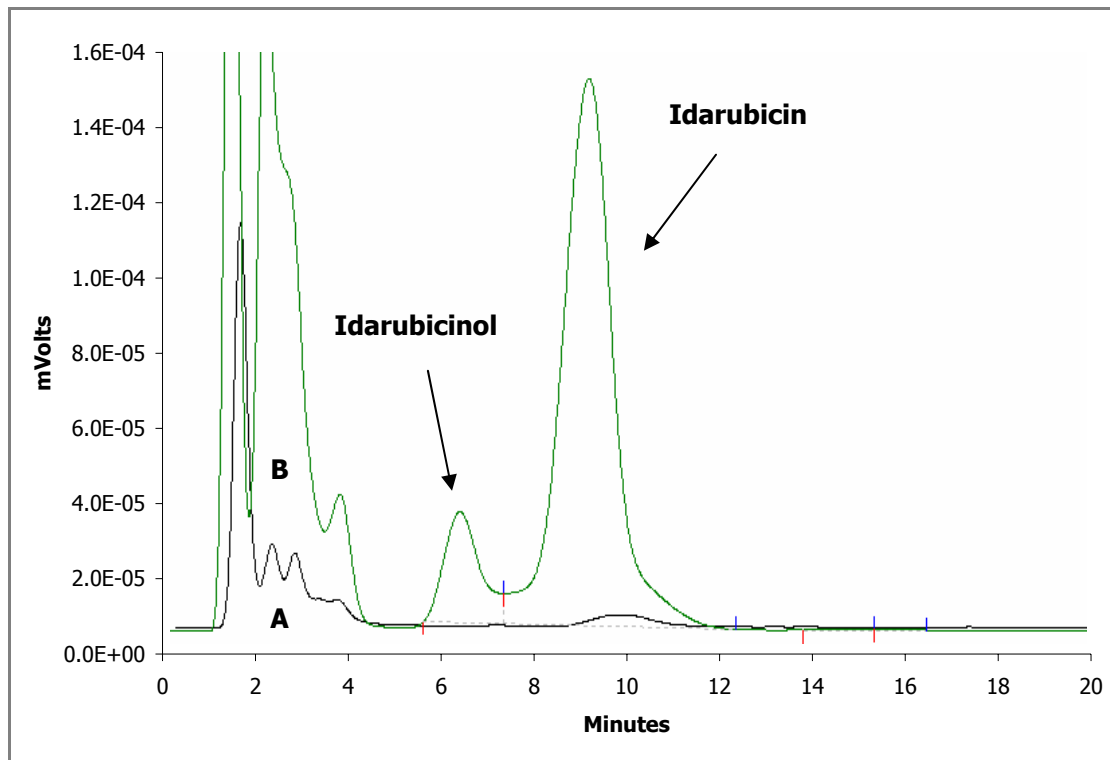


Abb. 3.7: Repräsentative HPLC-Chromatogramme von Idarubicin und Idarubicinol, erhalten nach Aufarbeitung der isolierten mononukleären Zellen eines Patienten, der eine 180-minütige Infusion mit 17.5 mg/m^2 Idarubicin erhalten hat. [A] Überstand der Zellen, [B] Zellen, die drei Stunden nach Start der Infusion gewonnen wurden.

Aufbereitung der Urinproben mittels Festphasen-Extraktion

Die Aufarbeitung der Urinproben erfolgte in Anlehnung an das von Sottani *et al.* (2004) entwickelte Verfahren.

In Abbildung 3.8 sind die HPLC-Chromatogramme, die als laufende Kontrolle der Festphasenextraktion erhalten wurden, dargestellt.

Chromatogramm A stellt dabei die wiederaufgefangene Urinprobe nach Auftrag auf die SPE-Kartusche dar. Das Chromatogramm zeigt keine Idarubicin- und Idarubicinol-Peaks, somit wurde bewiesen, dass beide Analyten erfolgreich auf der Säule zurückgehalten worden sind. Die Chromatogramme C und D wurden durch Auffangen des Phosphatpuffers während der beiden Spülvorgänge erhalten. Die Waschschritte zur Elimination von Verunreinigungen beeinträchtigten die

Analytenisolierung in keiner Weise, da keine Analytenpeaks nachzuweisen waren. Das Chromatogramm D repräsentiert den Elutionsschritt. Durch Zugabe des Dichlormethan/Isopropanol-Gemisches wurden beide Analyten quantitativ von der Säule eluiert. Bei einem sich anschließenden Waschschrift wurden keine Analytenpeaks mehr detektiert.

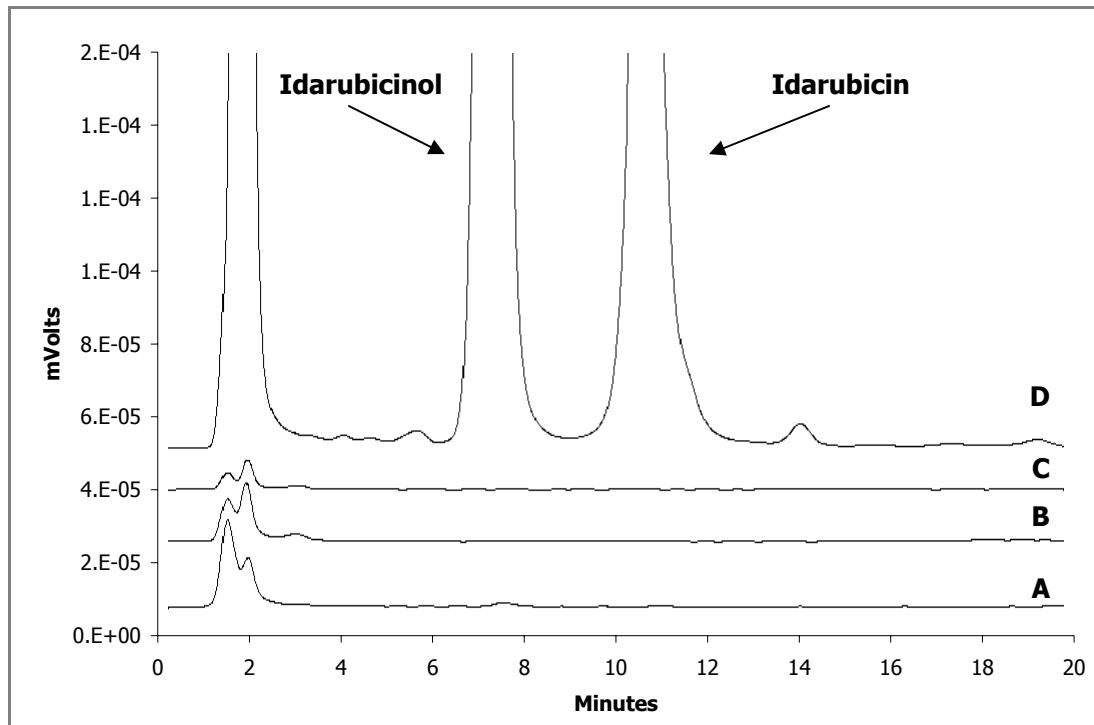


Abb. 3.8: Darstellung eines typischen HPLC-Elutionsprofils von Idarubicin und Idarubicinol nach Aufarbeitung einer Urin-Probe mittels Festphasenextraktion. Es handelte sich um den 24 h-Sammelurin einer Patientin, die eine 180-minütige Infusion mit 17.5 mg/m^2 Idarubicin erhalten hat. [A] Urinprobe nach dem Auftrag auf die SPE-Kartusche, [B] und [C] Waschschriffe, [D] Elutionsschritt.

3.3.2 Validierung

Die Validierung umfasste die Parameter Selektivität, Messbereich, Bestimmungsgrenze, Linearität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision, die gemäß den Anforderungen an bioanalytische Verfahren überprüft wurden. Die Definitionen dieser Validierungsparameter sind bereits unter Kapitel 2.3.2 angegeben.

3.3.2.1 Selektivität

Die Selektivität (s. auch Kap. 2.3.2.1) der hier angewandten Methoden konnte durch

das Fehlen von Störpeaks zu den Retentionszeiten der interessierenden Analyten in den untersuchten idarubicin- und idarubicinolfreien, aufgearbeiteten Matrices gezeigt werden. Die Abbildungen 3.9 - 3.11 zeigen die erhaltenen Chromatogramme der drei Matrices Plasma, mononukleäre Blutzellen und Urin.

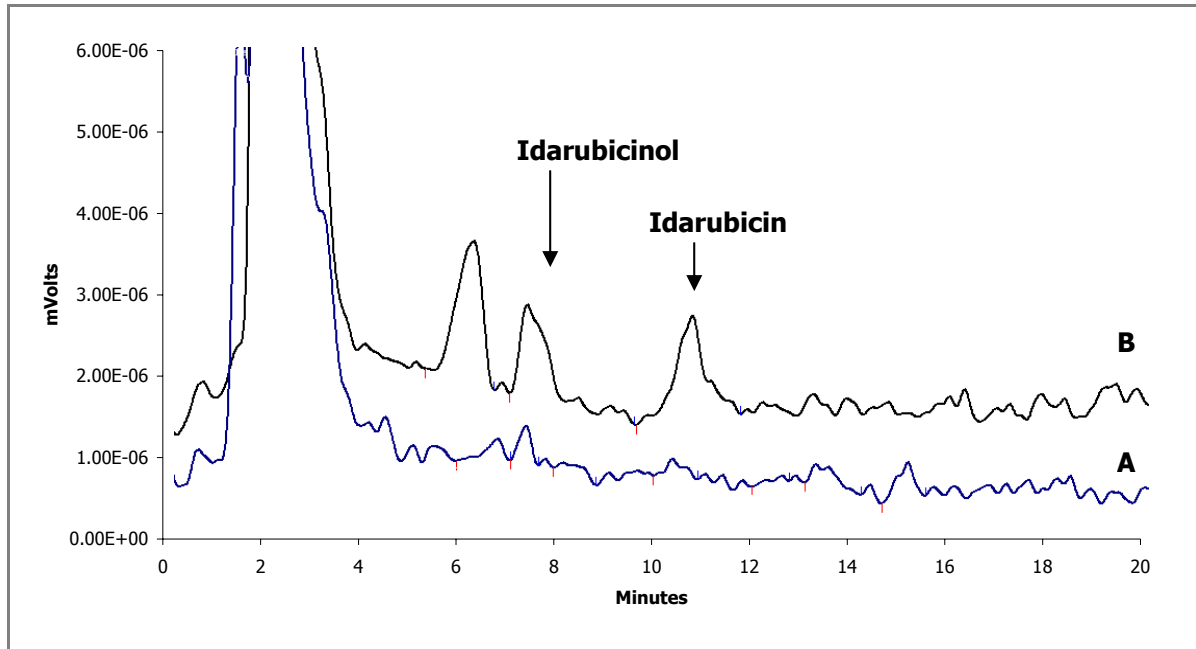


Abb. 3.9: Repräsentative HPLC-Chromatogramme von Idarubicin und Idarubicinol im Plasma. [A] leere Plasmamatrix, [B] Kalibrator 1 (0.5 ng/ml).

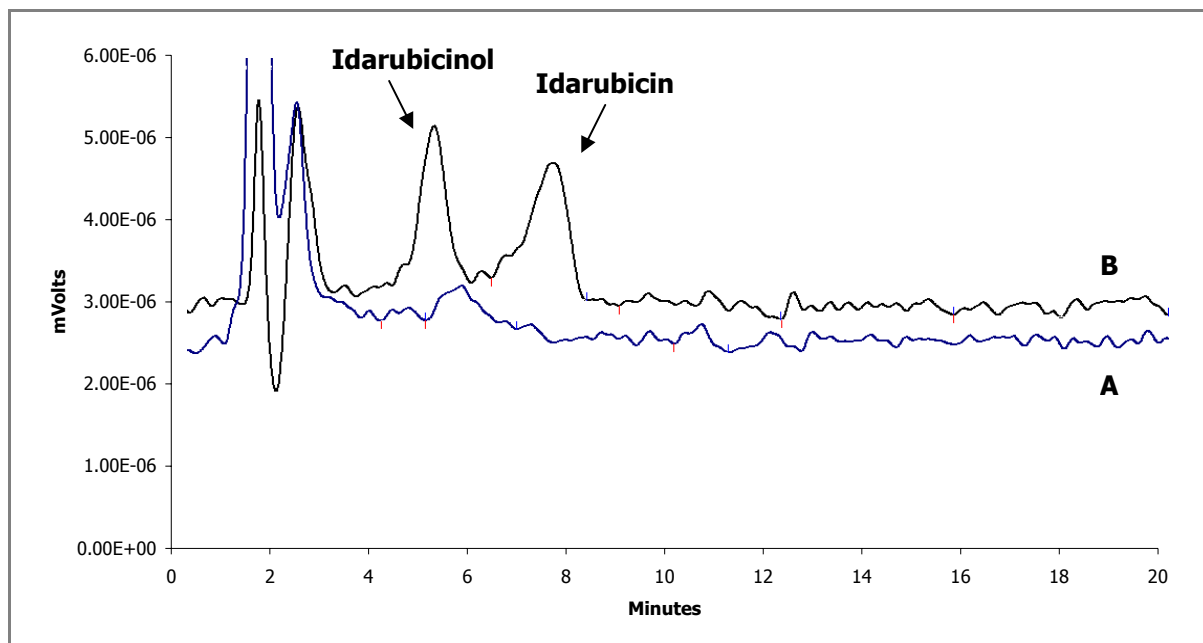


Abb. 3.10: Repräsentative HPLC-Chromatogramme von Idarubicin und Idarubicinol in Zellen. [A] Zellmatrix, [B] Kalibrator 1 (1 ng/ml).

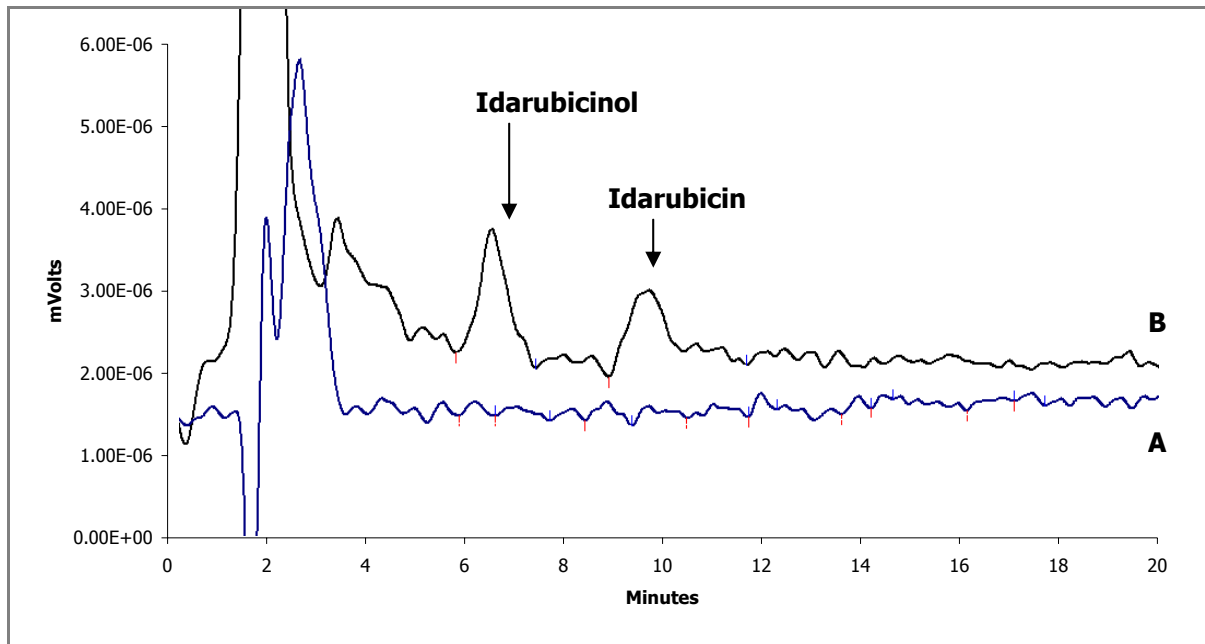


Abb. 3.11: Repräsentative HPLC-Chromatogramme von Idarubicin und Idarubicinol im Urin. [A] Urinmatrix, [B] Kalibrator 1 (10 ng/ml).

Die Chromatogramme der Leermatrizes (Abbildungsteil A) wurden mit den jeweils niedrigsten Kalibratoren (Abbildungsteil B) verglichen. Die erlangten Signale waren im Mittel fünfmal so hoch wie die Signale der Leermatrizes. Für alle drei Matrizes lag für beide Analyten eine ausreichend gute Auflösung vor.

3.3.2.2 Messbereich und Bestimmungsgrenze

Die zu bestimmenden Konzentrationen umfassten für beide Analyten einen Bereich von 0.5 - 250 ng/mL im Plasma und von 1 - 200 ng/ml in den mononukleären Blutzellen. Da sich mit den für den gesamten Bestimmungsbereich ermittelten Kalibriergeraden nur mangelhafte Ergebnisse für die niedrigen Konzentrationen (<10 ng/ml) produzieren ließen, wurde der Messbereich für beide Matrizes und Analyten in zwei Konzentrationsbereiche unterteilt. Für die niedrigen Konzentrationen wurde der Messbereich von 1 - 10 ng/ml gewählt und für die höheren Konzentrationen (>10 ng/ml) der gesamte Bereich der jeweiligen Matrix.

Für den Urin wurde der Messbereich auf Konzentrationen zwischen 10 - 500 ng/ml festgelegt.

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden die Signalflächen der analytenfreien Matrix und die Signalflächen des untersten Kalibrators aus sechs verschiedenen Kalibrierungen miteinander verglichen und die Verhältnisse berechnet.

Für beiden Analyten und für alle Matrices lagen die berechneten Verhältnisse im Mittel fünfmal so hoch, wie das der analytenfreien Matrix.

Weiterhin wurde bei sechs Kalibrierreihen, die an unterschiedlichen Tagen aufgenommen wurden, die Richtigkeit und Präzision der Bestimmung einer von der Kalibrierung unabhängigen Probe kontrolliert, die dieselbe Konzentration aufwies, wie der am niedrigsten konzentrierte Standard und die damit postulierte Bestimmungsgrenze. Die Konzentrationen sollten mit einem relativen Fehler von höchstens 20% und einer relativen Standardabweichung von höchstens 20% bestimmt werden können.

Wie Tabelle 3.4 zu entnehmen ist, konnten diese Proben für Idarubicin und Idarubicinol in den jeweiligen Konzentrationsbereichen und Matrices mit der erforderlichen Richtigkeit und Präzision quantifiziert werden.

Somit wurden als Bestimmungsgrenze für Idarubicin und Idarubicinol im Plasma 0.5 ng/ml, in den Zellen 1 ng/ml und im Urin 10 ng/ml ermittelt.

Tab. 3.4: Überprüfung der Bestimmungsgrenze anhand von Richtigkeit (RE [%]) und Präzision (RSD [%]) (n = 6).

Analyt	Konzentration [ng/ml]	RE [%]	RSD [%]
<i>Plasma</i>			
Idarubicin	0.5	-4.9	14.0
Idarubicinol	0.5	17.7	7.2
<i>Zellen</i>			
Idarubicin	1.0	10.2	17.5
Idarubicinol	1.0	1.2	13.8
<i>Urin</i>			
Idarubicin	10.0	-9.1	5.3
Idarubicinol	10.0	-14.1	4.7

3.3.2.3 Linearität

Die Korrelationskoeffizienten für beide Analyten lagen in jeder Matrix über $r = 0.99$, womit die erste Anforderung (s. Kap. 2.3.2.1) an die Linearität erfüllt war.

Die relativen Abweichungen der gemessenen Konzentration vom Nominalwert (s. Kap. 3.2.2.3 und Tab. 3.2) lagen für alle Kalibratoren unterhalb der geforderten 15%. Für die relativen Standardabweichungen wurden bis auf drei Konzentrationen Werte bis 15% ermittelt. Diese drei Konzentrationen befanden sich allerdings im Bereich der Nachweisgrenze, wo bis zu 20% Abweichung gestattet sind (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Interday-Richtigkeit (RE [%]) und -Präzision (RSD [%]) der Kalibratoren (n = 6).

Analyt	Parameter	Standards						
		1	2	3	4	5	6	7
Plasma		1	2	3	4	5	6	7
Idarubicin	RE [%]	11.1	7.4	7.3	9.5	-0.2	-2.7	0.4
	RSD [%]	13.8	15.0	3.7	0.9	2.1	0.8	0.3
Idarubicinol	RE [%]	1.3	5.3	-9.4	-9.6	-0.6	-2.8	0.5
	RSD [%]	18.7	12.0	2.8	1.5	2.2	0.8	0.4
Zellen		1	2	3	4	5	6	
Idarubicin	RE [%]	10.2	-3.7	-3.1	8.4	6.8	3.8	
	RSD [%]	20.1	4.7	1.9	5.0	1.3	2.2	
Idarubicinol	RE [%]	15.0	-14.2	-13.2	4.2	6.3	3.4	
	RSD [%]	14.4	4.0	5.2	4.8	1.9	0.7	
Urin		1	2	3	4	5	6	
Idarubicin	RE [%]	3.4	2.1	-0.4	-0.8	0.2	-4.2	
	RSD [%]	15.8	0.7	2.6	1.2	1.2	1.5	
Idarubicinol	RE [%]	11.6	3.3	-1.0	-1.4	0.4	10.4	
	RSD [%]	14.4	0.7	3.1	1.3	1.3	0.8	

3.3.2.4 Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate (WFR) wurden pro Matrix je vier Proben unterschiedlicher Konzentrationen, die die gesamten untersuchten Konzentrationsbereiche abdeckten, hergestellt und aufgearbeitet (Kap. 3.2.2.1). Außerdem wurden Lösungen in einem Gemisch von 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.4/Dimethylsulfoxid (90:10) hergestellt, deren Konzentrationen den Sollkonzentrationen nach der Aufarbeitung entsprachen. Alle Lösungen wurden jeweils sechsmal vermessen. Die Signalflächen der Matrixproben wurden mit denen der wässrigen Proben gleicher Konzentration verglichen, die ohne weitere Vorbereitung gemessen wurden. Die Gleichung zur Bestimmung der Wiederfindungsrate (WFR 1) befindet sich bereits in Kapitel 2.3.2.4.

Tab. 3.6: Mittlere Wiederfindungsrate (WFR [%]; MW \pm SD; jeweils n = 6).

Analyt	Konzentrationen	Plasma	Zellen	Urin
	Plasma/Zellen/Urin [ng/ml]	WFR 1	WFR 1	WFR 1
Idarubicin	1/5/10	90.8 \pm 11.9	94.2 \pm 11.1	72.6 \pm 0.7
	5/10/50	91.4 \pm 5.4	100.5 \pm 4.0	76.8 \pm 4.5
	10/50/100	93.5 \pm 2.7	92.7 \pm 4.5	67.0 \pm 0.7
	100/100/500	97.6 \pm 2.1	92.3 \pm 2.9	67.8 \pm 11.6
Idarubicinol	1/5/10	84.3 \pm 14.3	121.3 \pm 5.2	62.1 \pm 10.8
	5/10/50	95.0 \pm 4.0	113.5 \pm 5.0	66.4 \pm 0.5
	10/50/100	93.8 \pm 3.4	96.6 \pm 5.0	77.9 \pm 4.2
	100/100/500	98.5 \pm 0.8	95.2 \pm 1.9	71.9 \pm 1.6

Die ermittelten Daten (Tab. 3.6) zeigen, dass alle Matrizes und Aufarbeitungsschritte einen Einfluss auf die Signalflächen hatten.

Am deutlichsten war dieser Einfluss beim Urin, der durch viele enthaltene Stoffwechselprodukte einen sehr hohen chemischen Untergrund aufweist. Hier wurden im Mittel nur 71% Idarubicin und 69% Idarubicinol wiedergefunden.

Im Plasma konnten Wiederfindungsraten zwischen 84 und 99% ermittelt werden und in den Zellen wurden Wiederfindungsraten sowohl unter als auch über 100% detektiert.

Aufgrund dieser Daten war es notwendig eine matrixadaptierte Kalibrierung durchzuführen, um für die Kalibratoren wie auch für die zu vermessenden Proben einen ähnlichen Anteil an Matrixbestandteilen und somit ein ähnliches Element-Matrix-Verhältnis zu erhalten.

3.3.2.5 Richtigkeit und Präzision

Angaben zu den Definitionen der beiden Validierungsparameter befinden sich bereits in Kapitel 2.3.2.5.

Die für Idarubicin und Idarubicinol ermittelten Ergebnisse für die Parameter Richtigkeit und Präzision sind bereits unter dem Kapitel Linearität in Tabelle 3.5 wiedergegeben worden. Die relativen Abweichungen der gemessenen Konzentrationen vom Nominalwert und die relativen Standardabweichungen lagen für alle Kalibratoren im geforderten Bereich.

3.3.3 Individuelle Pharmakokinetik von Idarubicin und Idarubicinol

Im Rahmen dieser Studie wurde sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre Pharmakokinetik von Idarubicin und Idarubicinol nach Applikation von 17.5 mg/m² Idarubicin mit zwei unterschiedlichen Infusionszeitplänen bestimmt.

Insgesamt wurden 33 Patienten in die Studie aufgenommen, 11 männliche und 22 weibliche. Das Alter variierte zwischen 19 und 67 Jahren bei einem Median von 40 Jahren. Die Indikationen für eine chemotherapeutische Behandlung waren: Akute Myeloische Leukämie (24 Patienten) und Akute Lymphatische Leukämie (9 Patienten) (s. Kap. 3.2.3.2 und Tab. 3.3).

Zur Untersuchung des Einflusses der Infusionsdauer auf die Pharmakokinetik wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen eingeteilt. 15 Patienten erhielten Idarubicin als 30-minütige und 18 Patienten als 180-minütige Infusion.

Die demographischen Daten der beiden Infusionsgruppen sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Body Mass Index, Albumin-Spiegel und Creatinin-Clearance wurden für jeden Patienten dokumentiert.

Tab. 3.7: Demographische Daten der Patienten (n = 33) unter Berücksichtigung der Infusionsdauer.

	Gruppe 1 (n = 15) 30-Minuten Infusion	Gruppe 2 (n = 18) 180-Minuten Infusion
Diagnose (AML/ALL[†])	12/3	12/6
Geschlecht (Männer/Frauen)	6/9	5/13
Medianes Alter (Jahre)	37 ± 11	45 ± 13
Medianer BMI* (kg/m²)	22.8 ± 4.7	25.1 ± 4.8
Albumin-Spiegel (< 3.5/> 3.5 g/dl)	4/11	4/11
Creatinin-Clearance (< 70/70-140 ml/min)	6/9	11/6

[†]Akute Myeloische Leukämie, Akute Lymphatische Leukämie; *Body Mass Index.

Die beiden Gruppen zeigten bezüglich ihrer demographischen Parameter, bis auf den Body Mass Index (p = 0.01), keine signifikanten Unterschiede. Dieser Unterschied

spielte jedoch für die Auswertung der beiden Infusionsgruppen keine Rolle, da für die pharmakokinetischen Parameter von Idarubicin und Idarubicinol keine Zusammenhänge mit dem Body Mass Index gefunden werden konnten (s. Kap. 3.3.5).

Für die Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter in den mononukleären Blutzellen und im Plasma wurden von jedem Patienten drei Blutproben zu bestimmten Zeitpunkten (vor der Infusion, 3 h und 24 h nach Start der Infusion) abgenommen. Die Konzentrationen von Idarubicin und Idarubicinol wurden nach Aufarbeitung der Proben (Kap. 3.2.2.1) mittels einer validierten HPLC-Methode (Kap. 3.2.2.2) bestimmt. Für die pharmakokinetische Auswertung der ermittelten Daten wurde eine kompartmentunabhängige Datenanalyse durchgeführt. Für eine modellabhängige Analyse lagen nicht genügend Messzeitpunkte vor.

In den folgenden Kapiteln werden die Konzentrations-Zeit-Profile für Idarubicin und Idarubicinol im Plasma und in den Zellen dargestellt. Laut Literatur (Robert, 1993) wurden die Maxima der Wirkstoffspiegelkurven vermutlich sofort nach Ende der Infusion erreicht und lagen somit vor dem hier ermittelten 3 h-Messpunkt. Wann genau und wie hoch diese waren, lässt sich aus den hier betrachteten Daten nicht beurteilen. Für diese Studie wurden daher immer die Konzentrationen am 3 h-Messpunkt als Maximalwerte angenommen und miteinander verglichen.

3.3.3.1 Extrazelluläre Pharmakokinetik von Idarubicin und Idarubicinol

Konzentrations-Zeit-Profile

In Abbildung 3.12 sind die individuellen Plasmakonzentrations-Zeit-Profile von Idarubicin dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit wurden die Plasmaverläufe für die beiden Infusionsgruppen getrennt dargestellt.

Laut Literatur kann Idarubicin mit einem 2- oder 3-Kompartimentmodell in Übereinstimmung gebracht werden (Robert, 1993). Da innerhalb dieser Studie nur zwei Messwerte pro Patient zur Verfügung standen, konnte keine Aussage bezüglich eines eventuell vorliegenden mehrphasigen Verlaufs getätigt werden.

Die Plasma-Konzentrations-Zeit-Verläufe der Patienten mit dem 30-minütigen Infusionsplan entsprachen sich in etwa. Die maximalen Plasmaspiegel wurden in einem Bereich von 2.4 - 16.6 ng/ml detektiert. Die Variabilität für diesen Parameter konnte mit 56% bestimmt werden. Die mittlere maximale Plasmakonzentration betrug 6 ng/ml. Die Elimination verlief bei allen Patienten dieser Gruppe weitestgehend einheitlich, lediglich drei Patienten zeigten etwas kürzere Halbwertszeiten als die übrigen Patienten. Die mittlere Halbwertszeit wurde mit

7.6 ± 2.9 Stunden bestimmt.

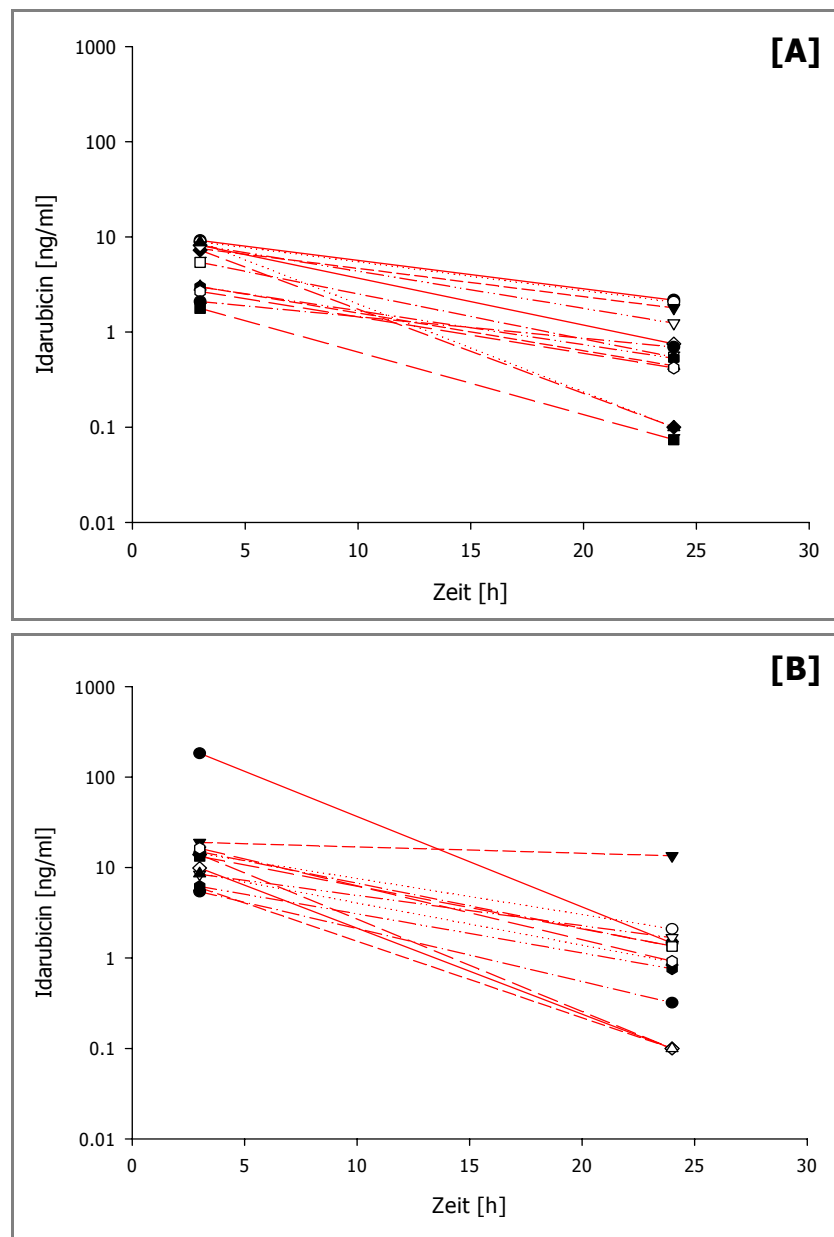


Abb. 3.12: Individuelle Plasmakonzentrations-Zeit-Profile von Idarubicin nach Applikation von 17.5 mg/m^2 Idarubicin über einen Zeitraum von [A] 30 Minuten ($n = 13$) und [B] 180 Minuten ($n = 12$).

In der Gruppe der Patienten mit der verlängerten Infusionsdauer (180 Minuten) betrug die maximale Plasma-Konzentration im Mittel 11.3 ng/ml . Die gemessenen Konzentrationen reichten insgesamt von $8.1 - 28.1 \text{ ng/ml}$. Zwei Patienten wurden aus der Berechnung ausgeschlossen (*Ausreißer-Test nach Henning*), da sie sehr hohe Konzentrationen zeigten, welche nicht schlüssig erklärt werden konnten. Die mittlere Plasmahalbwertszeit lag bei 5.2 ± 2.1 Stunden. Ein Patient zeigte eine Halbwertszeit

von 43.1 Stunden und wurde deshalb bei der Berechnung des Mittelwertes für diesen Parameter vernachlässigt.

In Abbildung 3.13 sind die Plasma-Konzentrations-Verläufe für den Metaboliten Idarubicinol dargestellt. Da Idarubicinol ähnlich wirksam ist wie die Muttersubstanz, ist die Betrachtung dieser Plasma-Konzentrations-Zeit-Profile genauso wichtig für die pharmakokinetische Auswertung.

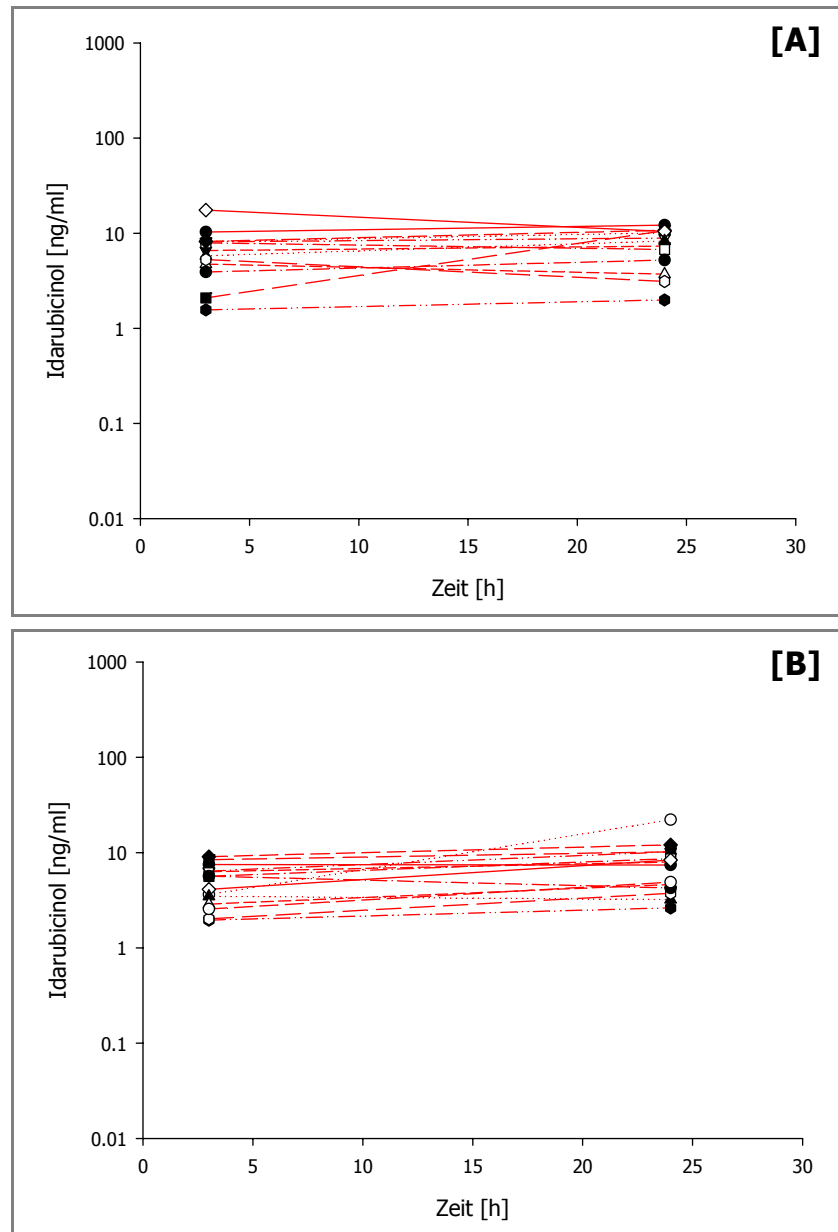


Abb. 3.13: Plasmakonzentrations-Zeit-Profile von Idarubicinol nach Applikation von 17.5 mg/m^2 Idarubicin über einen Zeitraum von [A] 30 Minuten ($n = 13$) und [B] 180 Minuten ($n = 12$).

Innerhalb der beiden betrachteten Infusionsgruppen konnten keine massiven Unterschiede zwischen den Patienten festgestellt werden. Die maximalen Plasmakonzentrationen lagen in einem Bereich von 2.0 - 18.9 ng/ml in der Gruppe mit der kurzen und von 3.5 - 22.1 ng/ml in der Gruppe mit der verlängerten Infusionszeit (unter Ausschluss der Ausreißer und Extremwerte).

Im Vergleich zu den jeweils gemessenen Konzentrationen der Muttersubstanz, die innerhalb des untersuchten Zeitraumes von im Schnitt 11.3 auf 0.7 ng/ml abfielen, zeigten die Konzentrationen des Metaboliten im Mittel eher einen leichten Anstieg von 5.7 auf 7.6 ng/ml. Die Halbwertszeit von Idarubicinol, die für diese Studie aufgrund fehlender späterer Zeitpunkte (nach dem 24 h-Wert) nicht rechnerisch bestimmt werden konnte, ist somit um einiges länger als die des Idarubicins.

Individuelle pharmakokinetische Parameter

Die Einzelergebnisse der ermittelten pharmakokinetischen Parameter im Plasma sind ergänzend zu den Konzentrations-Zeitprofilen in Tabelle 3.8 für die beiden Analyten Idarubicin und Idarubicinol aufgelistet.

Tab. 3.8: Einzelergebnisse der pharmakokinetischen modellunabhängigen Datenanalyse von Idarubicin und Idarubicinol im Plasma nach 30- und 180-minütiger Infusionsdauer (n = 27)*.

Patient [Abk.]	Infusions- dauer [min]	Idarubicin			Idarubicinol	
		t _{1/2} [h]	C _{max, 3h} [ng/ml]	AUC _{3-24h} [h*ng/ml]	C _{max, 3h} [ng/ml]	AUC _{3-24h} [h*ng/ml]
BG-02	30	10.1	11.3	119.3	12.2	235.6
BG-05	30	10.1	10.9	115.5	10.1	192.2
BG-06	30	10.1	9.2	97.9	7.3	145.8
BG-10	30	7.6	10.8	98.7	8.9	178.5
BG-14	30	4.5	2.8	19.4	10.6	133.4
BG-17	30	6.3	7.5	62.5	8.1	153.8
BG-19	30	3.4	13.3	77.0	10.7	198.9
BG-23	30	6.1	11.5	93.7	18.9	294.1
BG-24	30	3.3	16.6	93.1	8.3	147.5
BG-26	30	7.6	3.9	36.1	4.9	88.6
BG-29	30	8.4	3.8	36.8	2.0	37.3
BG-32	30	7.9	3.5	32.4	5.7	88.2

Patient [Abk.]	Infusions- dauer [min]	Idarubicin			Idarubicinol	
		$t_{1/2}$ [h]	$C_{max, 3h}$ [ng/ml]	AUC _{3-24h} [h*ng/ml]	$C_{max, 3h}$ [ng/ml]	AUC _{3-24h} [h*ng/ml]
BG-34	30	13.2	2.4	29.3	5.2	95.9
BG-01	180	3.0	364.2	1935.3	132.4	1137.7
BG-03	180	7.6	18.8	172.2	7.5	156.5
BG-07	180	43.1	19.8	339.7	22.1	270.5
BG-09	180	9.0	10.6	105.9	8.0	149.7
BG-11	180	6.4	18.3	154.4	10.2	174.3
BG-13	180	6.0	21.1	170.1	10.2	195.3
BZ-01	180	2.2	3433.7	14319.5	390.8	2625.6
BG-15	180	2.9	28.1	147.0	8.6	149.8
BG-16	180	3.2	19.1	105.0	12.1	221.9
BG-18	180	6.5	11.8	99.4	8.4	131.0
BG-20	180	3.6	10.7	63.7	3.5	70.2
BG-27	180	6.9	8.3	72.8	3.7	60.4
BG-28	180	5.1	24.6	180.9	5.9	104.0
BG-33	180	5.2	8.1	60.1	4.9	78.2

*Sechs Patienten konnten aufgrund unvollständiger Probenahmen nicht ausgewertet werden.

Innerhalb der beiden untersuchten Infusionsgruppen zeigten die Patienten eine hohe interindividuelle Variabilität im Hinblick auf die berechneten AUC-Werte des Idarubicins. In der Gruppe mit dem kurzen Infusionsprotokoll wurden AUC-Werte zwischen 19.4 und 119.3 ng*h/ml evaluiert, in der Gruppe mit der verlängerten Infusionsdauer lagen die Werte zwischen 60.1 und 180.9 ng*h/ml (unter Ausschluss der Ausreißer und Extremwerte). Die relativen Standardabweichungen lagen somit bei 50 und 38%.

Beim Vergleich der für Idarubicin ermittelten pharmakokinetischen Parameter mittels des *U-Tests nach Mann und Whitney* wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt. Die Verlängerung der Infusionsdauer führte zu einer Erhöhung der maximalen Plasmakonzentrationen ($p = 0.006$) und der AUC-Werte ($p = 0.007$). In Abbildung 3.14 ist der Unterschied zwischen den beiden Infusionsgruppen in Bezug auf die AUCs graphisch dargestellt.

Für Idarubicinol wurden keine signifikanten Unterschiede durch die Verlängerung der Infusionsdauer zwischen den Gruppen beobachtet ($p = 0.76$). Alle Werte lagen in einem gemeinsamen Bereich.

Der Metabolisierungsquotient $AUC_{\text{Idarubicinol}}/AUC_{\text{Idarubicin}}$ lag im Mittel bei 2.6 für die Gruppe mit der 30-minütigen Infusionsdauer und bei 1.0 für die Gruppe mit der verlängerten Infusionsdauer. Hier lag ein signifikanter Unterschied vor ($p = 0.02$).

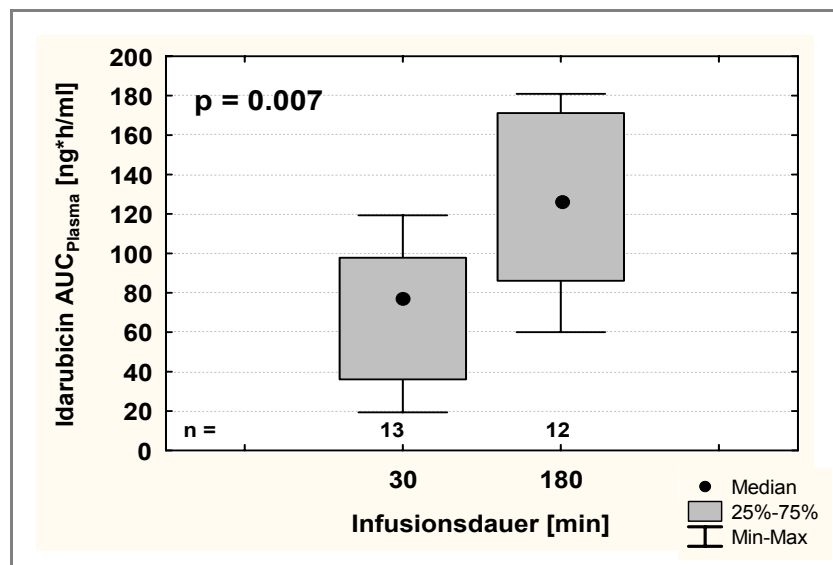


Abb. 3.14: Ermittelte AUC-Werte von Idarubicin im Plasma in Abhängigkeit von der Infusionsdauer ($n = 25$) (ohne Berücksichtigung eines Ausreißers).

3.3.3.2 Intrazelluläre Pharmakokinetik von Idarubicin und Idarubicinol

Der therapeutische Effekt des Idarubicins bzw. Idarubicinols ist abhängig von der zellulären Aufnahme der beiden Analyten, da diese ihre Hauptwirkung erst im Zellkern an der DNA entfalten (s. Kap. 3.1.2.2). Daher kann die Untersuchung der intrazellulären Konzentrationen für eine Beurteilung der Wirkung sehr wichtig sein.

Konzentrations-Zeit-Profile

Die intrazellulären Konzentrations-Zeit-Profile für Idarubicin sind in Abbildung 3.15 für die beiden Infusionsgruppen dargestellt.

Im direkten Vergleich zu den Plasma-Konzentrations-Zeit-Profilen, lagen die Profile der Zellen über einen etwas weiteren Konzentrationsbereich verstreut.

Bis auf eine Ausnahme zeigten die Patienten der 30-minütigen Infusionsdauer einen fast parallelen Verlauf ihrer Zellkonzentrationen. Die maximal gemessenen Konzentrationen in dieser Gruppe lagen in einem Bereich von $0.5 - 16.3 \text{ ng}/10^6$ Zellen. Die Variabilität dieses Parameters wurde mit 125% bestimmt. Die mittlere Halbwertszeit lag bei 10.5 ± 3.0 Stunden.

In der Gruppe mit der verlängerten Infusionsdauer lagen die maximal gemessenen Zellkonzentrationen zwischen 1.7 und 17.4 ng/10⁶ Zellen. Zwei Ausreißer zeigten maximale Konzentrationen von 72.5 und 74.9 ng/10⁶ Zellen. Die relative Standardabweichung ohne diese Ausreißer betrug 60%. Besonders auffällig in dieser Gruppe war die hohe Variabilität der Konzentrationen am 24 h-Messpunkt. Es wurden Werte zwischen 0.01 - 15.6 ng/10⁶ Zellen gemessen. Die mittlere Halbwertszeit lag bei 6.9 ± 3.5 Stunden.

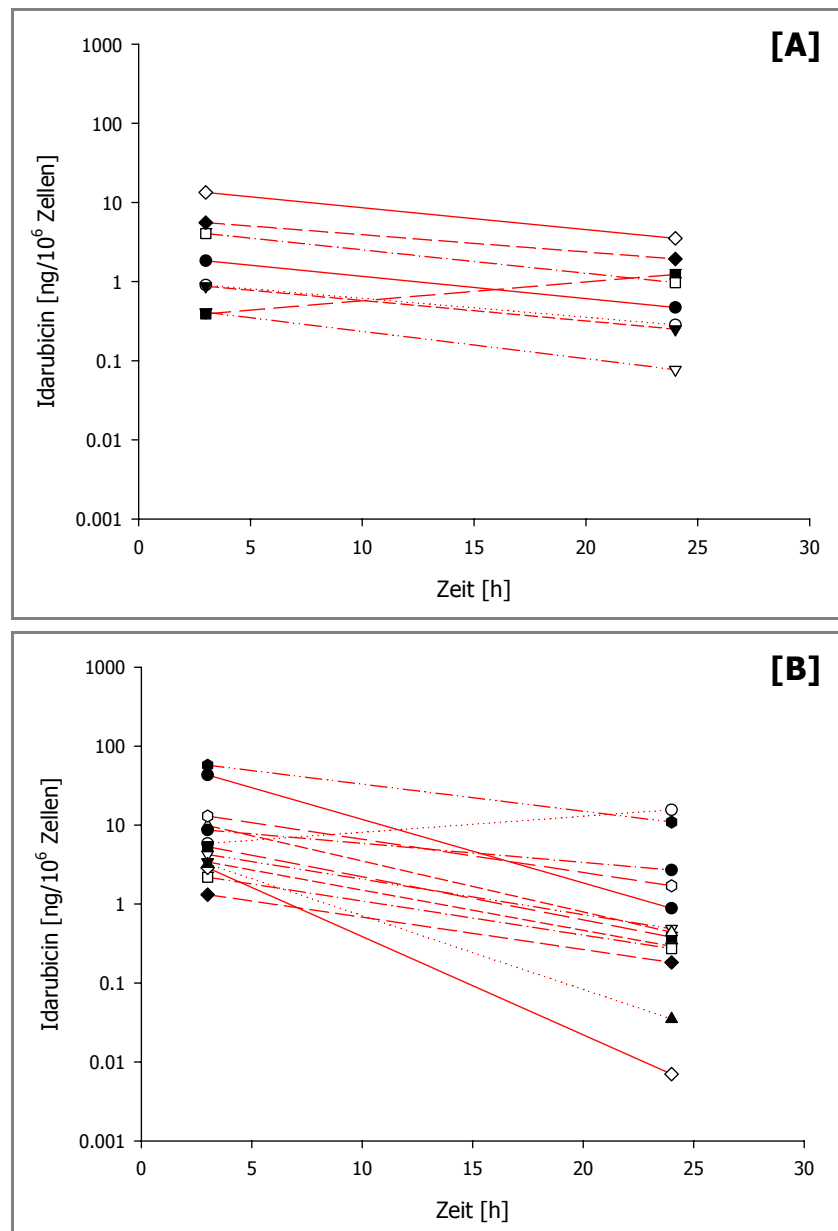


Abb. 3.15: Individuelle intrazelluläre Konzentrations-Zeit-Profile von Idarubicin nach Applikation von 17.5 mg/m² Idarubicin über einen Zeitraum von [A] 30 Minuten (n = 9) und [B] 180 Minuten (n = 13).

In Abbildung 3.16 sind die Zell-Konzentrations-Zeit-Verläufe für den Metaboliten Idarubicinol dargestellt.

Die Variabilität der in den Zellen gemessenen Kurven war ebenfalls größer als im Plasma. Maximale Konzentrationen von 0.3 bis 5.0 ng/10⁶ Zellen konnten für die Gruppe mit der kurzen Infusionsdauer gemessen werden. Die Konzentrationen für die andere Gruppe lagen in etwa in demselben Bereich. Ebenso wie im Plasma stiegen die Zell-Konzentrationen beider Gruppen in dem beobachteten Zeitraum leicht an. Doch im Unterschied zum Plasma war die Konzentration von Idarubicinol über den gesamten untersuchten Zeitraum niedriger als die von Idarubicin.

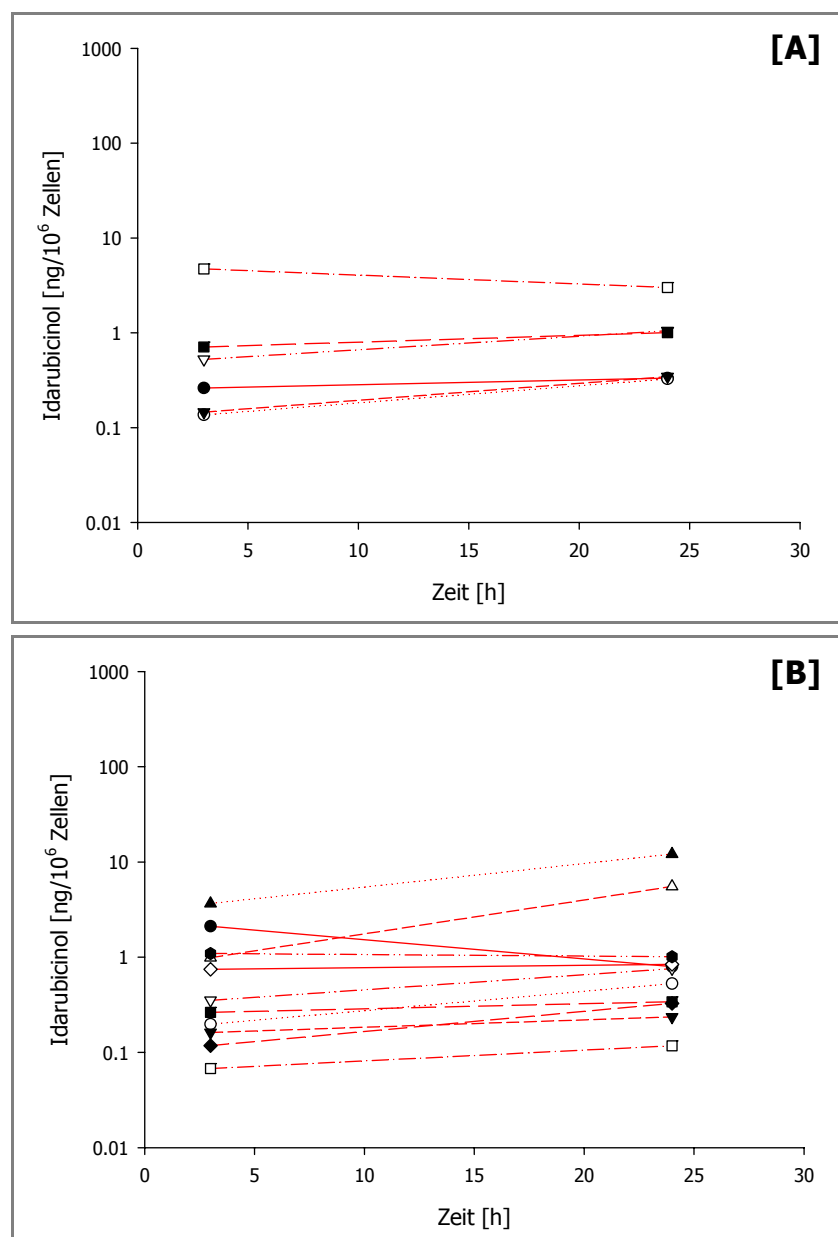


Abb. 3.16: Individuelle intrazelluläre Konzentrations-Zeit-Profile von Idarubicinol nach Applikation von 17.5 mg/m² Idarubicin über einen Zeitraum von [A] 30 Minuten (n = 6) und [B] 180 Minuten (n = 11).

Individuelle pharmakokinetische Parameter

Die individuellen Ergebnisse der intrazellulären pharmakokinetischen Parameter sind in Tabelle 3.9 für Idarubicin und Idarubicinol angegeben.

Tab. 3.9: Einzelergebnisse der pharmakokinetischen modellunabhängigen Datenanalyse von Idarubicin und Idarubicinol in mononukleären Blutzellen nach 30- und 180-minütiger Infusionsdauer (n = 22)*.

Patient [Abk.]	Infusions- dauer [min]	Idarubicin			Idarubicinol	
		t _{1/2} [h]	C _{max, 3h} [ng/10 ⁶ Zellen]	AUC _{3-24h} [h*ng/10 ⁶ Zellen]	C _{max, 3h} [ng/10 ⁶ Zellen]	AUC _{3-24h} [h*ng/10 ⁶ Zellen]
BG-06	30	10.7	2.2	24.3	0.3	6.2
BG-10	30	12.6	1.1	12.5	0.3	4.9
BG-14	30	11.6	1.0	11.8	0.4	5.1
BG-17	30	8.7	1.9	5.1	n.d.	n.d.
BG-19	30	3.4	0.5	3.2	n.d.	n.d.
BG-23	30	12.7	1.2	17.0	n.d.	n.d.
BG-26	30	10.2	5.0	52.8	1.1	16.6
BG-29	30	13.8	6.5	78.6	1.0	18.0
BG-34	30	10.9	16.3	178.1	5.0	81.1
BG-01	180	3.7	74.9	461.0	2.4	30.6
BG-07	180	14.9	15.6	224.8	0.5	7.6
BG-11	180	5.9	4.8	38.7	0.2	4.2
BG-13	180	6.7	5.8	49.6	0.8	11.6
BG-15	180	5.5	7.8	60.0	0.3	6.3
BG-16	180	7.0	2.9	25.7	n.d.	n.d.
BG-18	180	7.4	1.7	15.7	0.1	1.9
BG-20	180	2.4	6.8	30.2	0.3	4.7
BG-27	180	3.2	6.1	34.1	n.d.	n.d.
BG-28	180	4.7	15.4	108.0	0.8	16.6
BG-31	180	8.8	72.5	715.2	12.1	165.4
BG-33	180	7.2	17.4	154.5	5.5	68.4
BG-35	180	12.5	10.2	119.1	1.1	22.1

*11 Patienten konnten aufgrund unvollständiger Probenahmen oder Zellkonzentrationen unter der Bestimmungsgrenze nicht mit ausgewertet werden.

n.d. = nicht detektierbar.

Die ermittelten AUC-Werte für Idarubicin lagen in der Gruppe mit dem kurzen Infusionsprotokoll zwischen 3.2 und 78.6 ng*h/10⁶ Zellen und in der Gruppe mit dem verlängerten Protokoll zwischen 15.7 und 224.8 ng*h/10⁶ Zellen (Betrachtung jeweils ohne die berechneten Ausreißer).

Beim Vergleich der pharmakokinetischen Parameter der beiden Infusionsgruppen, wurden ähnliche Ergebnisse wie im Plasma erhalten. Die Erhöhung der Infusionsdauer führte auch hier zu statistisch signifikanten Unterschieden in Bezug auf die Zellkonzentrationen ($p = 0.01$) und die AUCs ($p = 0.03$).

Der mediane AUC-Wert für Idarubicin in der Gruppe des kurzen Infusionsprotokolls lag bei 17.0 ng*h/10⁶ Zellen und in der Gruppe des verlängerten Protokolls bei 60.0 ng*h/10⁶ Zellen (Abb. 3.17).

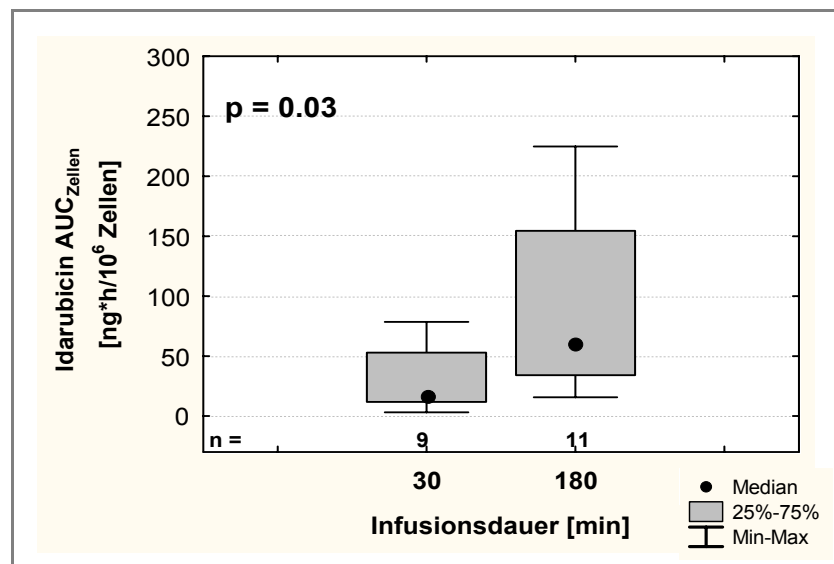


Abb. 3.17: Ermittelte AUC-Werte von Idarubicin (ohne Berücksichtigung von drei Ausreißern) in den mononukleären Blutzellen in Abhängigkeit von der Infusionsdauer ($n = 20$).

Für den Metaboliten konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen genau wie im Plasma detektiert werden.

Das Metabolisierungsverhältnis $AUC_{\text{Idarubicinol}}/AUC_{\text{Idarubicin}}$ in den Zellen lag im Mittel bei 0.35 für die Gruppe mit der 30-minütigen Infusionsdauer und bei 0.15 für die Gruppe mit der verlängerten Infusionsdauer. Hier lag ein ebenso ein signifikanter Unterschied vor ($p = 0.001$).

3.3.3.3 Beziehung zwischen den extra- und intrazellulären Konzentrationen

Durch das Auftragen der im Plasma und in den Zellen ermittelten Konzentrations-Zeit-Verläufe in einem Diagramm (Abb. 3.18), konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen in den Zellen um ein Vielfaches höher waren als im Plasma.

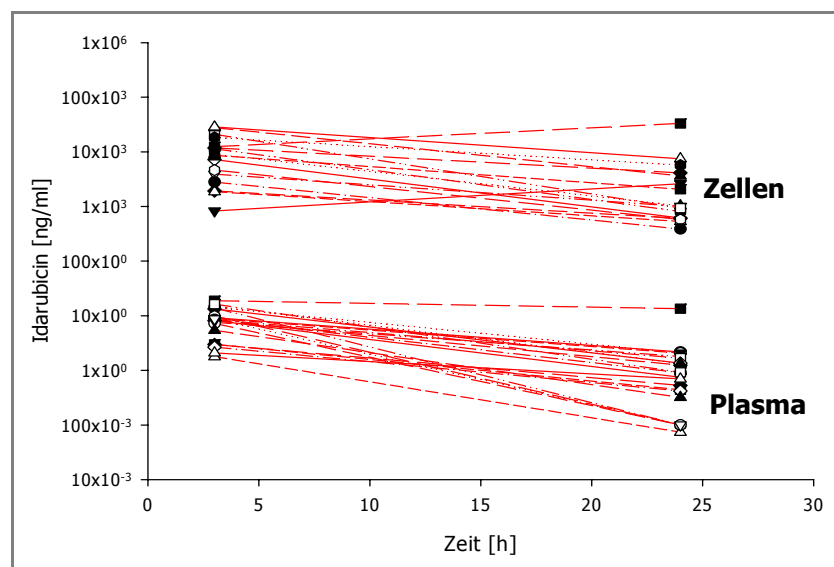


Abb. 3.18: Vergleich der extra- und intrazellulären Idarubicin-Konzentrationen .

Die Berechnung der individuellen AUC-Verhältnisse $AUC_{\text{Zellen}}/AUC_{\text{Plasma}}$ ergab für Idarubicin einen Mittelwert von 500 und für Idarubicinol einen Mittelwert von 65. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit anderen zuvor durchgeführten Studien (Robert, 1993; Borchmann *et al.*, 1997). Sie sprechen dafür, dass Idarubicin und sein Metabolit Idarubicinol sehr schnell in die Zellen aufgenommen werden und sich dort anreichern.

Beim Vergleich der intrazellulären und extrazellulären Halbwertszeiten konnte festgestellt werden, dass Idarubicin etwas langsamer aus den Zellen eliminiert wird, als aus dem Plasma. Für Idarubicinol konnte diesbezüglich keine Aussage aufgrund der hier fehlenden Halbwertszeiten vorgenommen werden (s. Kap. 3.3.3.1).

Korrelierte man die individuellen AUC-Werte von Idarubicin im Plasma mit den jeweiligen AUC-Werten von Idarubicin in den Zellen (ohne die Ausreißer), so konnte kein linearer Zusammenhang festgestellt werden (Abb. 3.19). Der Korrelationskoeffizient wurde mit $r = -0.08$ bestimmt. Ein ähnliches Ergebnis wurde für den Metaboliten Idarubicinol erhalten.

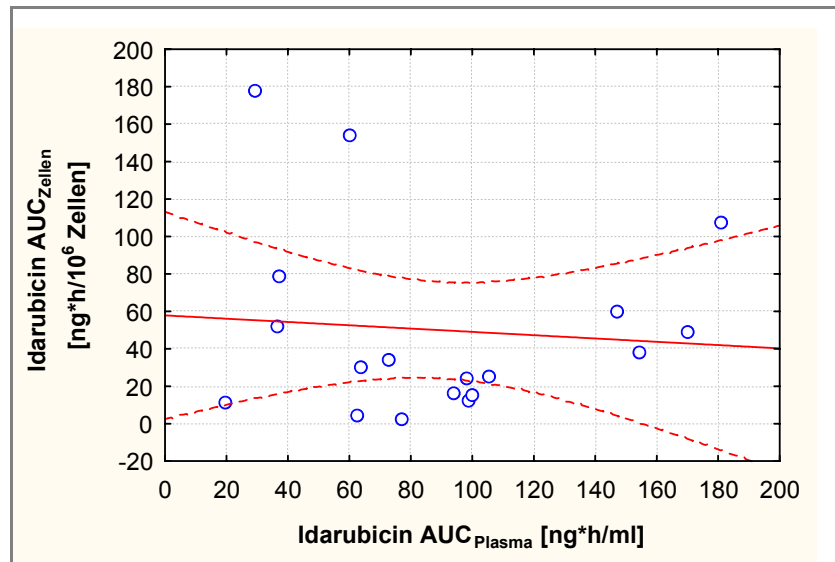


Abb. 3.19: Zusammenhang zwischen der extrazellulären und der intrazellulären AUC von Idarubicin ($n = 18$, \circ individuell bestimmte AUC-Werte, -----95%-Konfidenzintervall).

3.3.3.4 Untersuchung der renalen Elimination

Für die Untersuchung des Einflusses der Infusionsdauer auf die renale Elimination, wurde von insgesamt 10 Patienten (je fünf Patienten pro Infusionsgruppe) der 24 h-Urin gesammelt.

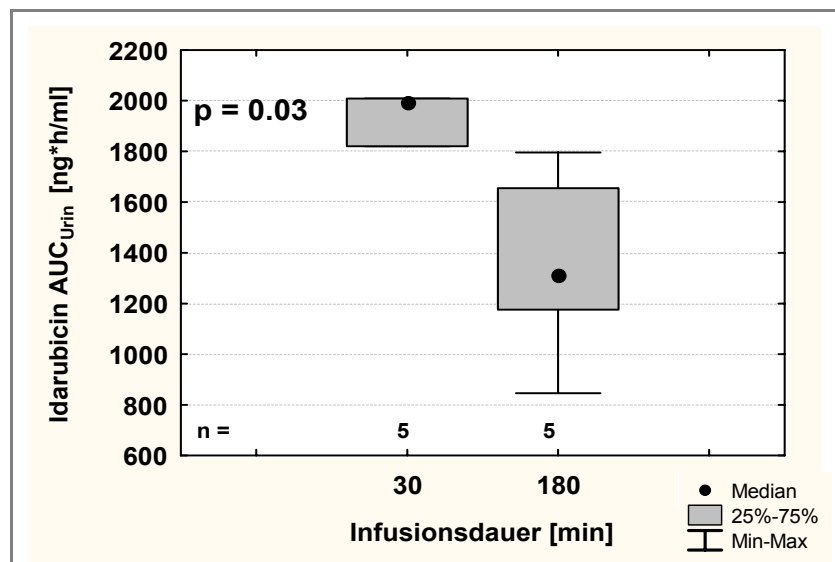


Abb. 3.20: Ermittelte AUC-Werte von Idarubicin im Urin in Abhängigkeit von der Infusionsdauer ($n = 10$); Darstellung ohne zwei Extremwerte.

Insgesamt wurden nur 0.8 - 3.2% der als i.v.-Infusion verabreichten Muttersubstanz unverändert im Urin wiedergefunden. 0.9 - 7.3% der verabreichten Idarubicin-Dosis wurden in Form des Metaboliten Idarubicinol detektiert.

Vergleicht man die beiden Infusionsgruppen in Bezug auf die Urinausscheidung mit Hilfe der berechneten AUC_{Urin} (Abb. 3.20), so kann festgestellt werden, dass die Gruppe mit der kurzen Infusionsdauer signifikant mehr Idarubicin in den betrachteten 24 Stunden ausscheidet als die Gruppe mit der verlängerten Infusionsdauer.

Das Ergebnis konnte durch die Gegenüberstellung der renalen Idarubicin-Clearances der beiden Infusionsgruppen bestätigt werden (Abb. 3.21). Im Falle der kurzen Infusionsdauer errechnete sich eine mediane Clearance von 14 l/h und im Falle der verlängerten Infusionsdauer betrug die mediane Clearance 3 l/h. Da für die Berechnung der renalen Clearance die ermittelte AUC_{Plasma} von Nöten war, konnte die Auswertung nur für sieben der 10 Patienten durchgeführt werden.

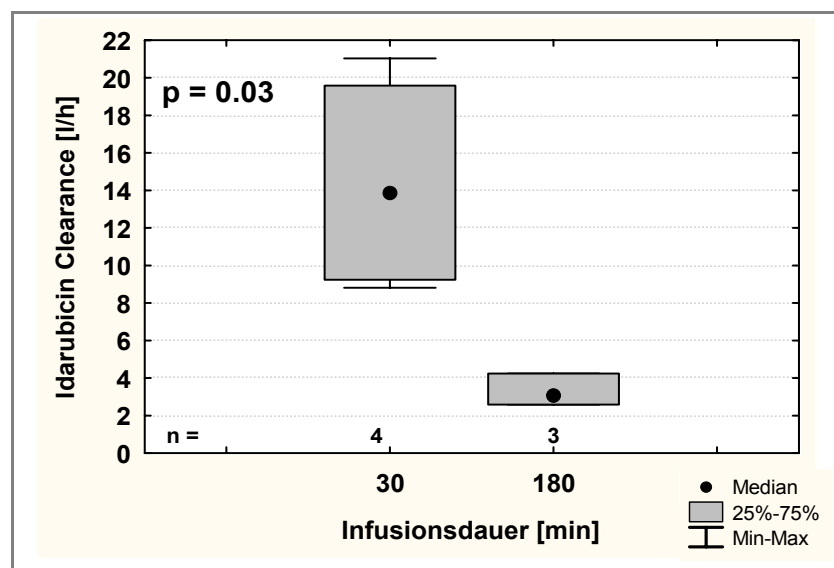


Abb. 3.21: Abhängigkeit der renalen Idarubicin-Clearance von der Infusionsdauer (n = 7).

3.3.4 Einfluss des Albumin-Spiegels auf die Pharmakokinetik

Da Idarubicin eine recht hohe Plasmaproteinbindung vorweist (Kessel *et al.*, 1999), kann die Aufnahme der Substanz in die Zelle gegebenenfalls durch diese beeinflusst werden.

Im Zuge dieser klinischen Studie wurden daher die Albumin-Spiegel der Patienten dokumentiert und mit den erhaltenen pharmakokinetischen Parametern korreliert (s. Kap. 3.3.5).

Des Weiteren wurden die beiden bestehenden Infusionsgruppen (30 min und 180 min), der Höhe des Albumin-Spiegels entsprechend in je zwei Untergruppen aufgeteilt. So gab es für jede Infusionsgruppe eine Untergruppe mit einem niedrigen Albumin-Spiegel, d.h. mit Werten die unter 3.5 g/dl lagen und eine Untergruppe mit normwertigen Albumin-Spiegeln, die gleich oder größer 3.5 g/dl waren.

In Abbildung 3.22 [A] und [B] ist der Einfluss des Albumin-Spiegels und der Infusionsdauer auf die Plasma- und Zell-AUCs anhand eines Boxplots dargestellt.

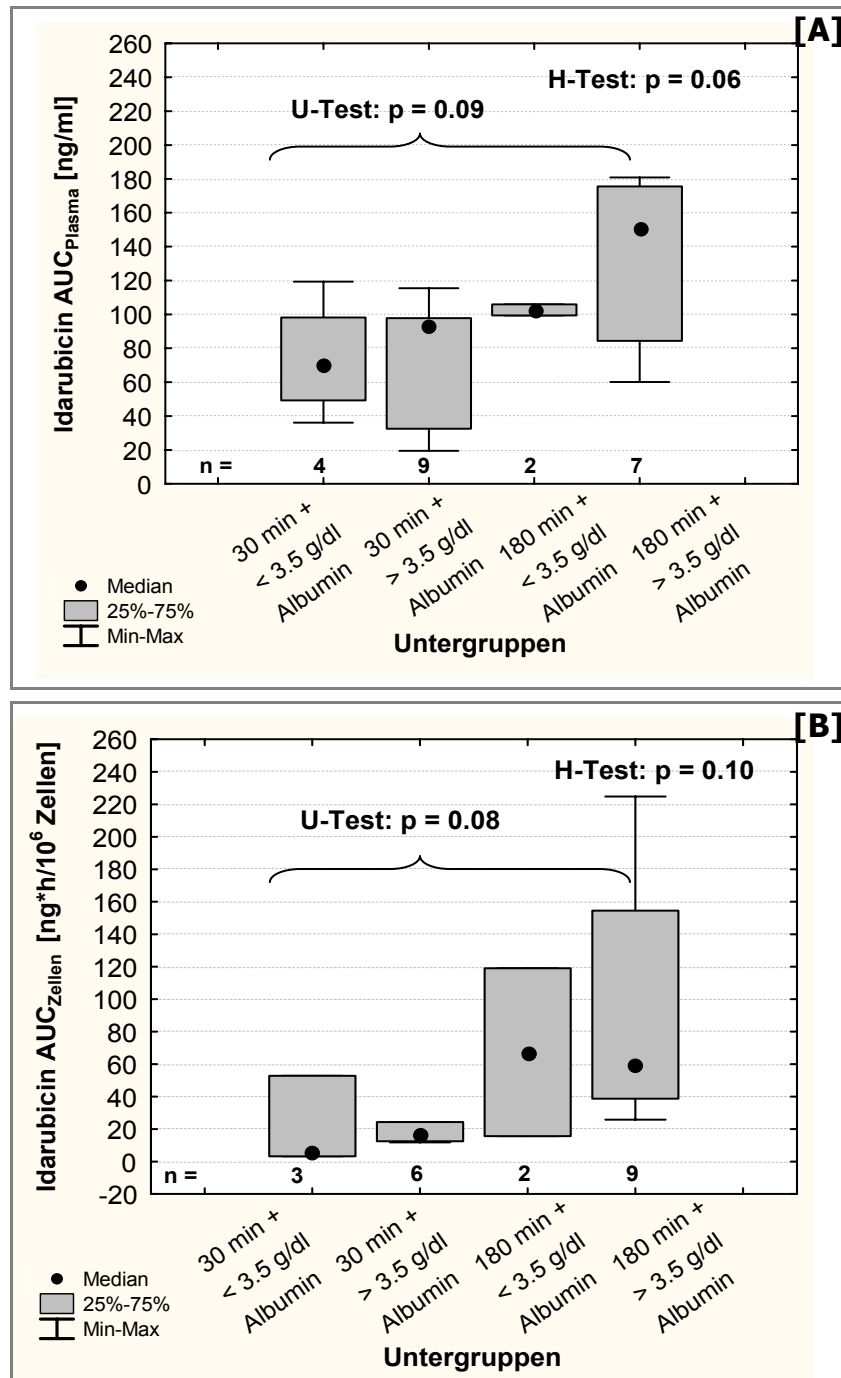


Abb. 3.22: Abhängigkeit der Plasma- [A] und Zell-AUC [B] von der Infusionsdauer und dem Albumin-Spiegel ($n_{\text{Plasma}} = 22$, $n_{\text{Zellen}} = 20$); Darstellung ohne zwei Ausreißer.

Zur Berechnung des jeweiligen Unterschiedes zwischen den Gruppen, wurde der *H-Test nach Kruskal-Wallis* durchgeführt.

Die berechneten p-Werte ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede für die betrachteten Untergruppen ($p = 0.06$ für die Plasma-AUCs und $p = 0.10$ für die Zell-AUCs). Jedoch konnte aus den Graphiken ein Trend abgelesen werden. Die medianen Plasma-AUC-Werte für die vier Gruppen betragen in der Reihenfolge von der kurzen Infusionsdauer mit niedrigem Albumin-Spiegel zu der verlängerten Infusionsdauer mit normwertigem Albumin-Spiegel 69.7, 93.1, 102.7 und 150.7 ng/ml. Für die Zell-AUCs ergaben sich in derselben Reihenfolge die Werte 5.1, 20.6, 67.4 und 60 ng*h/10⁶ Zellen.

3.3.5 Individuelle Einflussfaktoren auf die Idarubicin-Pharmakokinetik

Die dokumentierten Patientencharakteristika wurden mit der Pharmakokinetik des Idarubicins und seines Metaboliten Idarubicinol korreliert, da die individuellen Faktoren wie Alter, Gewicht, Körpergröße, Körperoberfläche, Body Mass Index, Albumin-Spiegel, und Creatinin-Clearance einen Einfluss auf die Verteilung den Metabolismus und die Elimination haben können. Die Korrelation dieser Faktoren wurde mit Hilfe der *Rangkorrelation nach Spearman* durchgeführt. Als Ergebnisse (Tab. 3.10) sind die jeweils ermittelten Korrelationskoeffizienten (r) angegeben.

Innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs konnte weder ein Zusammenhang für die intrazelluläre noch für die extrazelluläre Pharmakokinetik der beiden Analyten mit den untersuchten Faktoren festgestellt werden.

Die geschlechtsspezifische Überprüfung der pharmakokinetischen Parameter ergab einen signifikanten Unterschied für die Höhe der erreichten Konzentrationen ($C_{\max,3\text{ h}}$) in den mononukleären Blutzellen für Männer und Frauen ($p = 0.03$). So wurden mediane C_{\max} -Werte von 7.8 ng*h/10⁶ Zellen in den Blutzellen der Männer und von 2.2 ng*h/10⁶ Zellen in den Blutzellen der Frauen gemessen. Auch die medianen AUC-Werte zeigten Unterschiede zwischen den Geschlechtern, die allerdings nicht statistisch signifikant waren ($p = 0.06$).

Um zu überprüfen, ob der Einfluss des Geschlechts auf die C_{\max} in den Blutzellen auf die geringere Körperoberfläche, die geringere Körpergröße oder das geringere Körpergewicht der weiblichen Patienten zurückzuführen war, wurden die Zell-Konzentrationen auf jeweils einen der oben genannten Parameter normiert. Die Signifikanz blieb danach nur noch für die Normierung auf die Körpergröße bestehen.

Tab. 3.10: Einfluss der Patientencharakteristika auf die Pharmakokinetik unabhängig von der Infusionsdauer.

Parameter	Alter (r)*	Gewicht (r)*	Größe (r)*	KOF (r)*	BMI (r)*	Albumin (r)*	Creatinin- Clearance (r)*
Intrazelluläre Pharmakokinetik							
Idarubicin							
C _{max}	0.356	0.210	0.216	0.187	0.141	0.302	0.068
t _{1/2}	-0.014	-0.299	-0.466	-0.371	-0.268	-0.230	-0.331
AUC _{3-24h}	0.344	0.192	0.093	0.165	0.139	0.237	0.001
Idarubicinol							
C _{max}	0.274	-0.268	-0.044	-0.303	0.110	-0.038	-0.300
AUC _{3-24h}	0.222	-0.230	0.009	-0.256	0.093	0.010	-0.259
Extrazelluläre Pharmakokinetik							
Idarubicin							
C _{max}	0.197	0.050	0.040	0.125	-0.065	0.108	0.112
t _{1/2}	-0.088	0.144	-0.080	0.121	-0.028	-0.221	-0.169
AUC _{3-24h}	0.299	0.156	-0.027	0.193	0.001	0.070	0.061
Idarubicinol							
C _{max}	-0.198	-0.070	-0.146	0.005	-0.233	-0.119	0.038
AUC _{3-24h}	-0.080	-0.087	-0.266	-0.069	-0.189	-0.140	0.004
Renale Clearance							
Idarubicin	-0.143	-0.107	-0.505	-0.214	0.071	-0.771	-0.179
Idarubicinol	-0.607	-0.643	-0.324	-0.750	-0.536	-0.143	-0.357
Metabolisierungsverhältnis AUC_{Zellen}/AUC_{Plasma}							
Idarubicin	0.245	-0.034	0.074	-0.051	-0.150	0.378	-0.127
Idarubicinol	0.028	-0.386	0.274	-0.269	-0.341	0.341	-0.297

*(r) = Korrelationskoeffizienten nach Spearmans Rangkorrelation.

3.3.6 Tumoransprechen

Bei allen untersuchten Patienten wurde das Ansprechen des Tumors auf die verabreichte Therapie durch die behandelnden Onkologen gemäß den in Kapitel 3.2.4.3 beschriebenen Kriterien bewertet.

Insgesamt betrug die Ansprechrates in dieser Studie, in der 33 Patienten behandelt worden waren 55% mit 16 kompletten und 2 partiellen Remissionen.

21% der Patienten zeigten kein oder nur ein ungenügendes Ansprechen auf die Therapie und 24% der Patienten verstarben, bevor der Response untersucht wurde. Die Ansprechraten in Abhängigkeit von der Infusionsdauer sind in Tabelle 3.11 dargestellt.

Tab. 3.11: Tumoransprechen nach wöchentlicher Applikation von 17.5 mg/m² Idarubicin in Abhängigkeit von der Infusionsdauer.

Tumoransprechen	Gruppe 1	Gruppe 2
	(n = 15) 30-Minuten Infusion	(n = 18) 180-Minuten Infusion
Komplette Remission	8 (53%)	8 (44%)
Partielle Remission	1 (7%)	1 (6%)
Non-Responder	3 (20%)	4 (22%)
Early Death	3 (20%)	5 (28%)

Für die Untersuchung eines eventuell vorhandenen Zusammenhangs zwischen den bestimmten pharmakokinetischen Größen und dem Tumoransprechen wurden die intrazellulären und extrazellulären AUCs der Patienten in Abhängigkeit vom Ansprechen und der Infusionsdauer betrachtet (Abb. 3.23 [A] und [B]).

Für jede Infusionsdauer gab es somit zwei Untergruppen; jeweils eine Gruppe mit einer kompletten Remission und eine Gruppe mit keinem oder nur ungenügendem Ansprechen.

Von den insgesamt 33 Patienten waren 20 für die extrazelluläre und 17 für die intrazelluläre Pharmakokinetik auswertbar.

Zur Berechnung des jeweiligen Unterschiedes zwischen den Gruppen, wurde der *H-Test nach Kruskal-Wallis* durchgeführt. Die berechneten p-Werte ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede für die betrachteten Untergruppen ($p = 0.17$ für die Plasma-AUCs und $p = 0.16$ für die Zell-AUCs).

Verglich man die AUCs der Non-Responder und der kurzen Infusionsdauer (30 min + NR) mit denen der kompletten Responder und der verlängerten Infusionsdauer (180 min + CR), so konnte eine Tendenz abgelesen werden. Die mediane AUC für die erstgenannte Gruppe betrug im Plasma 64.1 ng*h/ml und in den Zellen 17.0 ng*h/10⁶ Zellen, während für die zweitgenannte Gruppe eine mediane AUC von 141.0 ng*h/ml im Plasma und von 108.0 ng*h/10⁶ Zellen in den Zellen bestimmt wurde. Somit gab es für die beiden näher betrachteten Untergruppen eine Verdopplung der AUC im Plasma und eine Versechsfachung der AUC in den Zellen.

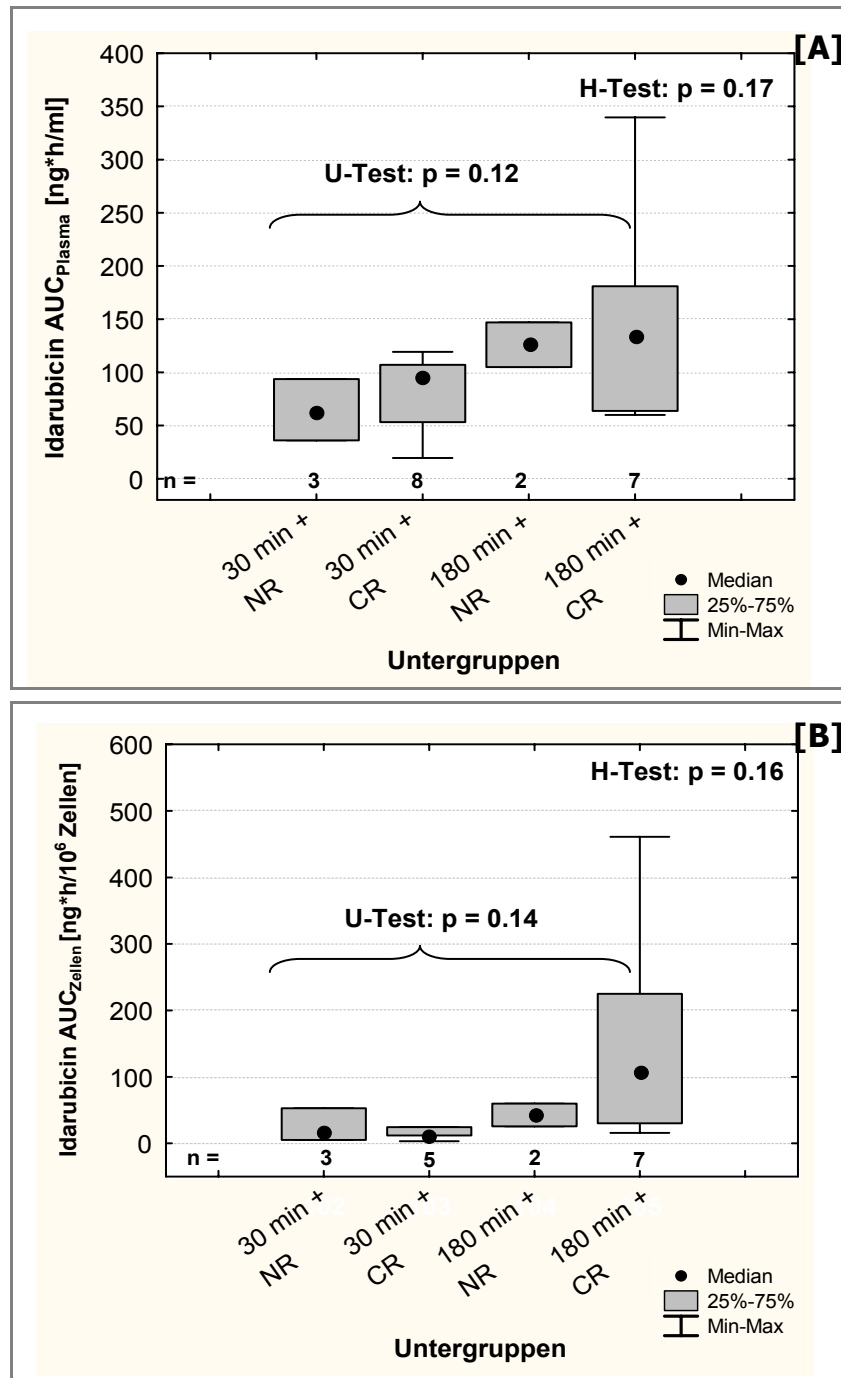


Abb. 3.23: Beziehungen zwischen der Plasma-[A] und Zell-AUC [B] und dem Tumoransprechen in Abhängigkeit von der Infusionsdauer ($n_{\text{Plasma}} = 20$, $n_{\text{Zellen}} = 17$); CR = Komplette Remission, NR = Non-Responder; Darstellung ohne Ausreißer.

3.4 Diskussion der Ergebnisse

3.4.1 Bioanalytische Quantifizierungsmethoden von Idarubicin und Idarubicinol in biologischen Matrices

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Idarubicin und Idarubicinol in unterschiedlichen Matrices, namentlich Plasma, mononukleäre Blutzellen und Urin, quantifiziert werden. Für die Probenaufarbeitung aus den unterschiedlichen Matrices wurden literaturbekannte bioanalytische Verfahren (Kuhlmann *et al.*, 1999; Gieseler *et al.*, 1994; Sottani *et al.*, 2004) modifiziert. Zur Quantifizierung der aufgearbeiteten Analyten wurde die von Kuhlmann *et al.* (1999) entwickelte HPLC-Methode in abgewandelter Form eingesetzt.

Im Folgenden werden die Methoden dieser Arbeit mit den genannten Literaturverfahren (Kuhlmann *et al.*, 1999; Gieseler *et al.*, 1994; Sottani *et al.*, 2004) hinsichtlich der Probenaufarbeitung und der validierten Parameter verglichen. Darüber hinaus wird ein Vergleich mit weiteren in der Literatur beschriebenen Verfahren, soweit vorhanden, durchgeführt.

Für eine Quantifizierung von Idarubicin und Idarubicinol im Plasma werden, neben der hier modifizierten, angewandten Methode von Kuhlmann *et al.* (1999), alternative Methoden (Camaggi *et al.*, 1992; Eksborg *et al.*, 1989; Fogli *et al.*, 1999) beschrieben.

Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgt dabei jeweils auf unterschiedliche Arten. So nutzen Eksborg *et al.* (1989) und Fogli *et al.* (1999) das Prinzip der Flüssig-flüssig-Extraktion zur Isolierung der beiden interessierenden Analyten, während Camaggi *et al.* (1992) das Prinzip der sogenannten Festphasenextraktion verwendeten. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Probenaufarbeitung wurde das Prinzip der Plasmaproteinfällung nach Kuhlmann *et al.* (1999) verwendet. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu den zwei anderen Methoden liegt in den weniger aufwendigen präparativen Aufarbeitungsschritten und dem niedrigeren Materialverbrauch, bei gleichwertigen bis besseren Ergebnissen in Bezug auf die Validierungsparameter. Des Weiteren wurden geringere Plasmamengen zur Isolation der beiden Analyten benötigt.

Kuhlmann *et al.* (1999) haben für die Plasmaproteinfällung lediglich Acetonitril verwendet, während im Rahmen dieser Arbeit eine Mischung aus Acetonitril, Methanol und 85%-iger Phosphorsäure verwendet wurde. Der Säurezusatz soll für eine effektivere Fällung sorgen. Eine weitere im Rahmen der vorliegenden Arbeit

durchgeführte Modifikation bestand in dem zusätzlichen Einfrierschritt. Dieser Schritt erhöhte die Langlebigkeit der HPLC-Säule merklich, da das gefällte Protein nach dem Einfrieren besser abgetrennt werden konnte.

Für die im Rahmen dieser Arbeit modifizierte Methode wurden ähnliche Validierungsparameter bestimmt, wie in der Original-Arbeit von Kuhlmann *et al.* (1999). Die Bestimmungsgrenzen für beide Analyten lagen in dieser Arbeit bei 0.5 ng/ml, bei Kuhlmann *et al.* (1999) lagen sie mit 2.5 ng/ml etwas höher. Die geforderte Linearität konnte in beiden Studien über den gesamten Messbereich nachgewiesen werden, die Korrelationskoeffizienten lagen über $r = 0.999$. Die berechneten Wiederfindungsraten für Idarubicin und Idarubicinol lagen in dieser Studie für beide Analyten bei im Mittel 93% und bei Kuhlmann *et al.* bei 95% für Idarubicin und bei 91% für Idarubicinol. Die Präzisionen in dieser Studie für die Konzentrationen ab 5 ng/ml waren besser als 4%, bei den kleineren Konzentrationen wurden höhere Abweichungen erhalten, die aber immer im geforderten Bereich von 15% bzw. 20% im Bereich der Bestimmungsgrenze lagen. Bei Kuhlmann *et al.* (1999) wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

Die Retentionszeiten für die modifizierte HPLC-Methode lagen mit 7 und 10 Minuten für Idarubicinol und Idarubicin etwas später, damit Interferenzen mit der Matrix zu frühen Zeitpunkten vermieden wurden.

Die Aufarbeitung der Zellproben in dieser Arbeit umfasste eine Zellyse, durch Zugabe von Isopropanol und HCl zu den isolierten mononukleären Blutzellen sowie einen anschließenden Zentrifugationsschritt. In anderen Studien zur Bestimmung *intrazellulärer* Anthrazyklin-Konzentrationen (Speth *et al.*, 1986; Speth *et al.*, 1987; Baurain *et al.*, 1978) wurden die isolierten Zellen mittels Ultraschall zerstört und die so freigesetzten Analyten hiernach mittels Flüssig-flüssig-Extraktion isoliert.

Im Vergleich mit den hier zitierten Analyseverfahren zeichnete sich die angewandte Methode durch eine einfachere Probenaufarbeitung aus. Die Nachweisgrenze für die Zellen in dieser Studie lag für beide Analyten bei 1 ng/ml. Die Wiederfindungsrate betrug im Mittel 95% für Idarubicin und 107% für Idarubicinol. Richtigkeit und Präzision der Methode wurden anhand der *Interday*-Richtigkeit und -Präzision bestimmt. Die relativen Abweichungen der gemessenen Konzentrationen vom Nominalwert und die relativen Standardabweichungen lagen im geforderten Bereich. Die hier ermittelten Validierungsparameter konnten nicht mit den literaturbeschriebenen Methoden verglichen werden, da eine Validierung in dieser Form dort nicht durchgeführt wurde.

Die Urinproben wurden nach einem Verfahren von Sottani *et al.* (2004) mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet.

Im Vergleich zu der Methode von Sottani *et al.* (2004) wurde in dieser Studie, anstelle der HPLC/MS/MS-Methode, eine einfache HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Dabei wurde die Methode von Kuhlmann *et al.* (1999) für Urinproben weiterentwickelt. Die Bestimmungsgrenze in dieser Arbeit lag für beide Analyten bei 10 ng/ml, während die Bestimmungsgrenze bei Sottani *et al.* (2004) bei 0.03 ng/ml ermittelt wurde. Allerdings wurden dort keine Urinproben von Patienten vermessen, sondern von Krankenhausangestellten, die mit den Zytostatika nur indirekt bei der Herstellung in Kontakt kamen. Auf eine weitere Modifizierung der Probenaufarbeitung zur Senkung der Quantifizierungsgrenze wurde verzichtet, da im Rahmen dieser Arbeit alle zu vermessenden Urinproben deutlich über der Konzentration von 10 ng/ml lagen und somit hinreichend genau charakterisiert werden konnten. Die Anforderungen an Richtigkeit und Präzision konnten für alle untersuchten Konzentrationen gut erfüllt werden.

Die Wiederfindungsrate in dieser Studie betrug im Mittel 71% für Idarubicin und 70% für Idarubicinol, während in der Studie von Sottani *et al.* (2004) Wiederfindungsraten von 96 und 91% erreicht wurden. Der große Unterschied ergab sich vermutlich durch die Wahl der HPLC-Methode. Durch die vielen enthaltenen Stoffwechselprodukte im Urin weist dieser einen sehr hohen chemischen Untergrund auf, der offensichtlich nicht vollständig durch die Festphasenextraktion eliminiert wurde und somit die detektierten Signale der Analyten gequench wurden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass alle angewandten Methoden sich durch einfache Probenaufarbeitung, kurze Analysenzeiten und ausreichend niedrige Bestimmungsgrenzen auszeichneten. Die Anforderungen an bioanalytische Verfahren wurden damit voll erfüllt.

3.4.2 Klinische Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Idarubicins

Eine der ernst zu nehmensten Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Anthrazyklinen ist die Kardiotoxizität, welche in einer akuten und einer chronischen Form auftreten kann. Das Risiko steigt im Allgemeinen mit der verabreichten Dosis. In den letzten Jahren wurden deshalb viele Strategien entwickelt (Wouters *et al.*, 2005), um die Morbidität und Mortalität der anthrazyklinbedingten Kardiotoxizität zu senken. Im Zuge dieser Untersuchungen konnte in einigen *in vivo* Studien (Legha, *et al.*, 1982; Lum *et al.*, 1985) gezeigt werden, dass die Verlängerung der Infusionsdauer zu einer reduzierten Kardiotoxizität bei gleichbleibender Effektivität

der Therapie führte. In einer *in vitro* Studie von Gieseler *et al.* (2000) zur zellulären Pharmakokinetik des Idarubicins konnte über dies hinaus nachgewiesen werden, dass die Verlängerung der Infusionsdauer zu einer Zunahme der Apoptose-Rate führte. In anderen Studien ergaben sich keine Veränderungen durch die Verlängerung der Infusionsdauer, so dass diese Strategie bis heute kontrovers diskutiert bleibt (Minotti *et al.*, 2004).

Die meisten der bis dato durchgeführten Studien zur Verlängerung der Infusionsdauer bezogen sich auf die Untersuchung der Pharmakokinetik des Daunorubicins (Legha, *et al.*, 1982; Lum *et al.*, 1985). In den letzten Jahren ist Idarubicin zunehmend wichtig für die klinische Routine geworden. Idarubicin unterscheidet sich von den anderen Anthrazyklinen vor allem dadurch, dass sein Metabolit Idarubicinol ebenso aktiv ist, wie seine Muttersubstanz und dass Idarubicin oral appliziert werden kann.

In einer *in vivo* Studie von Eksborg *et al.* (1997), wurde zum ersten Mal der Effekt einer verlängerten Infusionsdauer auf die Idarubicin-Pharmakokinetik untersucht.

Die Mehrzahl der durchgeführten Idarubicin-Studien (Camaggi *et al.*, 1992; Gillies *et al.*, 1987; Reid *et al.*, 1990), wie auch die erwähnte Studie von Eksborg *et al.* (1997), beschäftigten sich mit der Untersuchung der Pharmakokinetik im Plasma. Tidefelt *et al.* (1989) konnten jedoch in einer Studie mit Doxorubicin und Epirubicin zeigen, dass die Konzentrationen im Plasma und in den isolierten leukämischen Zellen keiner linearen Beziehung folgten. Die zytotoxische Wirkung ist jedoch abhängig von der Aufnahme in die Tumorzelle und der anschließenden Interaktion mit dem Replikationsprozess (Gieseler *et al.*, 1994).

3.4.2.1 Einfluss der Infusionsdauer auf die pharmakokinetischen Parameter des Idarubicins

Im Rahmen der hier durchgeführten Studie sollte nun erstmals der Einfluss der Infusionsdauer auf die *extra-* und *intrazelluläre* Idarubicin-Pharmakokinetik untersucht werden.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigten eine hohe interindividuelle Variabilität der ermittelten pharmakokinetischen Parameter und stehen damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Studien (Hollingshead *et al.*, 1991; Robert *et al.*, 1993).

Beim Vergleich der *extra-* und *intrazellulären* Idarubicin-Konzentrationen konnte

ebenso, wie in den *in vitro* und *in vivo* Studien zuvor (Gieseler *et al.*, 1994; Speth *et al.*, 1986), gezeigt werden, dass die *intrazelluläre* Akkumulation sehr hoch ist. In den Zellen wurden bis zu 10 000-fach höhere Konzentrationen als im Plasma gefunden. Setzte man die ermittelten *extra-* und *intrazellulären* AUCs miteinander ins Verhältnis, so ergaben sich für Idarubicin im Mittel 500-fach und für Idarubicinol 65-fach höhere AUCs in den Zellen.

Stellte man eine Korrelation zwischen den *extra-* und *intrazellulären* AUCs für Idarubicin und Idarubicinol auf, so ergab sich, wie auch bei Epirubicin und Doxorubicin zuvor (Tidefelt *et al.*, 1989), keine lineare Beziehung zwischen den beiden Kompartimenten. Dieses Ergebnis zeigt, wie schwierig es ist, die Effektivität der Therapie anhand der *extrazellulären* AUCs zu beurteilen, obwohl dies in der Praxis oft durchgeführt wird (Schalhorn *et al.*, 2001).

Der Vergleich der hier ermittelten *extra-* und *intrazellulären* pharmakokinetischen Parameter mit denen anderer, zuvor durchgeführter Studien, ist schwierig, da sich die Methodik der verschiedenen Studien stark auf die pharmakokinetischen Parameter auswirkt. Neben der angewandten Analytik für Idarubicin spielen auch die Anzahl und Abnahmezeitpunkte der ausgewerteten Proben, das zur Auswertung verwendete pharmakokinetische Modell und das untersuchte Patientenkollektiv hinsichtlich der Variabilität der Ergebnisse eine wichtige Rolle.

In der hier durchgeführten Studie standen lediglich zwei Messpunkte nach dem Start der Infusion zur Verfügung, um die interessierenden Parameter wie die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC), die terminale Halbwertszeit und die maximal erreichten Plasma- bzw. Zellkonzentrationen (C_{\max}) zu berechnen. Bei C_{\max} handelte es sich hier um die gemessene Konzentration zum Zeitpunkt der ersten Probennahme (s. Kap. 3.3.3).

Um den genauen Verlauf der Idarubicin- bzw. Idarubicinol-Wirkstoffspiegelkurven zu ermitteln, müssten weitaus mehr Blutabnahmen erfolgen. Ein vernünftiges Schema für die Abnahme von Blutproben nach *intravenöser* Applikation laut Derendorf *et al.* (2002) ist z.B. 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 Minuten und dann im Halbstunden- oder Stundentakt bis zu 12 Stunden. Die weitere Probennahme hängt von den pharmakokinetischen Eigenschaften der jeweiligen Substanz sowie der analytischen Nachweisgrenze ab. Dies wäre für die Patienten dieser Studie nicht zumutbar gewesen. Der Zugewinn an Genauigkeit für die Bestimmung der hier benötigten Parameter war ferner nicht nötig, da diese in erster Linie nicht mit den pharmakokinetischen Parametern anderer Studien verglichen werden sollten, sondern dazu dienten, zwei unterschiedliche Infusionsprotokolle innerhalb dieser Studie miteinander zu vergleichen. Nach einem Limited Sampling

Model für Anthrazykline nach Eksborg *et al.* (1990) ist sogar eine einzige Blutprobe zur Abschätzung der AUC ausreichend.

Wie eingangs erwähnt, befassten sich Eksborg *et al.* (1997) mit der Untersuchung des Einflusses der Infusionsdauer auf die *extrazelluläre* Pharmakokinetik. Der Vergleich der dort ermittelten pharmakokinetischen Parameter für eine 2-Minuten-Infusion und eine 2-Stunden-Infusion ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede. Ein gegenteiliges Ergebnis wurde in der hier durchgeführten Studie erhalten. Durch die Verlängerung des Infusionsprotokolls von 30 auf 180 Minuten ergaben sich sowohl im Plasma, als auch in den Zellen signifikante Unterschiede in den für Idarubicin-ermittelten $C_{\max,3h}$ - und AUC-Werten. Für den aktiven Metaboliten Idarubicinol wurden hingegen keine Unterschiede detektiert.

Die unterschiedlichen Idarubicin-AUCs können zum einen dadurch erklärt werden, dass die Patienten mit dem kurzen Infusionsprotokoll eine höhere renale oder biliäre Elimination, bedingt durch höhere Konzentrationen freien, nicht an Plasmaproteine-gebundenen Idarubicins, aufwiesen. Zur Überprüfung dieser These wurde der 24-h-Urin von 10 Patienten, je fünf Patienten pro Infusionsprotokoll, gewonnen. Tatsächlich zeigten die Patienten mit der kurzen Infusionsdauer von 30 Minuten eine höhere renale Clearance, als die Patienten mit der verlängerten Infusionsdauer. So konnte für die Gruppe mit der kurzen Infusionsdauer eine mittlere Clearance von 14 l/h und für die Gruppe mit der verlängerten Infusionsdauer eine Clearance von 3 l/h detektiert werden.

Es ist jedoch zu bedenken, dass im Mittel nur 2% der absolut verabreichten Idarubicin-Dosis unverändert im Urin gefunden wurden. Für Idarubicinol lag der prozentuale Anteil mit im Mittel 4% nur etwas höher als für die Muttersubstanz. Die Überprüfung der dargelegten These mit Hilfe von Stuhlproben wurde bisher nicht durchgeführt, da die Untersuchung der biliären Exkretion laut Studien von Tamassia *et al.* (1987) und Pannuti *et al.* (1986) zu ähnlich hohen prozentualen Idarubicin- und Idarubicinol-Anteilen im Stuhl führten. Ein Großteil der Idarubicin-Dosis wird wahrscheinlich in Form von nicht-fluoreszierenden und polareren Metaboliten ausgeschieden (z.B. 13-Dihydroxy-Idarubicin).

Daraus muss geschlossen werden, dass die oben dargelegte Hypothese nicht allein für die erhöhten AUC-Werte nach Verlängerung der Infusionsdauer verantwortlich sein kann.

Ein weiterer Ansatz, die im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelten Unterschiede zu erklären, wurde in der Betrachtung der individuellen Unterschiede zwischen den beiden Applikationsgruppen gesucht. So zeigten die beiden Infusionsgruppen

bezüglich ihrer demographischen Parameter einen signifikanten Unterschied in den medianen BMIs.

Idarubicin hat ein sehr hohes Verteilungsvolumen, was auf eine hohe Gewebeverteilung hindeutet (Hollingshead *et al.*, 1991). Unterschiede im BMI könnten daher unter Umständen für die ermittelten Unterschiede in den AUCs verantwortlich sein. Um eine individuelle Beeinflussung ausschließen zu können, wurden, außer dem BMI, die patientenindividuellen Faktoren wie Alter, Gewicht, Größe und Körperoberfläche mit der *extrazellulären* und der *intrazellulären* Pharmakokinetik korreliert. Keiner der untersuchten Faktoren zeigte eine positive Korrelation mit der Pharmakokinetik.

Ein weiterer Grund, der gegen die BMI-Hypothese spricht, ist die Tatsache, dass die Patienten mit dem kleineren BMI niedrigere AUC-Werte zeigten, als die Patienten mit dem höheren BMI. Bei Annahme der Hypothese hätten die Ergebnisse jedoch genau entgegengesetzt vorliegen müssen.

3.4.2.2 Einfluss des Albumin-Spiegels auf die Pharmakokinetik

Die zytotoxische Wirkung von Chemotherapeutika ist abhängig von der Aufnahme in die Tumorzelle. Die Proteinbindung der Pharmaka im *extrazellulären* Kompartiment hat großen Einfluss auf diese Prozesse, da sie die freie Pharmakon-Konzentration bestimmt, die zur Aufnahme in die Zelle zur Verfügung steht (Kessel *et al.*, 1999).

Zur Proteinbindung der Anthrazykline tragen mehrere Proteine bei, von denen Humanalbumin das wichtigste ist. Dies bestätigte sich bei physiologischen Humanalbumin-Konzentrationen von 4 g/dl mit einer Proteinbindung von 85% für Idarubicin (Kessel *et al.*, 1999).

Zur hohen Proteinbindung von Idarubicin trägt vor allem dessen Lipophilie bei, welche die Bindung an die Plasmaproteine, insbesondere an die Lipoproteine, erhöht (Chassany *et al.*, 1994). Schwankungen im Humanalbumin-Anteil können daher einen großen Einfluss auf die freie Konzentration des Zytostatikums haben. *In vivo* können die Proteinkonzentrationen aufgrund von genetischen Variationen, physiologischen oder pathologischen Zuständen erheblich variieren (Hervé *et al.*, 1994). Physiologischerweise sinkt der Serumalbumingehalt z.B. mit dem Alter, unabhängig vom Gesundheitszustand; ebenso zeichnen sich Tumorpatienten durch erniedrigte Werte aus (Veering *et al.*, 1990).

In der hier vorliegenden Studie wurde zunächst der Einfluss des Albumin-Spiegels unabhängig von der Infusionsdauer auf die *intra-* und *extrazellulären* pharmakokinetischen Parameter mit Hilfe einer Korrelationsanalyse überprüft. Die

erhaltenen Ergebnisse ließen auf keine lineare Beziehung zwischen den untersuchten Parametern schließen.

Untersuchte man die ermittelten *intra*- und *extrazellulären* Idarubicin AUC-Werte in Abhängigkeit vom Albumin-Spiegel und der Infusionsdauer, so ergaben sich folgende Ergebnisse, die jedoch nur einen Trend darstellten: Patienten mit normwertigen Albumin-Spiegeln und der verlängerten Infusionsdauer zeigten höhere mediane AUC-Werte im Plasma ($p = 0.09$) und in den Zellen ($p = 0.08$), als die Patienten mit den erniedrigten Albumin-Spiegeln und der kurzen Infusionsdauer.

In Abbildung 3.24 ist ein vereinfachtes Schema der Pharmakokinetik von Idarubicin abgebildet. Eine mögliche Erklärung für den oben genannten Trend wäre, dass die Patienten mit normwertigem Albumin-Spiegel im Gegensatz zu den Patienten mit Albumin-Mangel ein Depot bilden und dass so mehr Idarubicin aus diesem Depot in die Zellen gelangt.

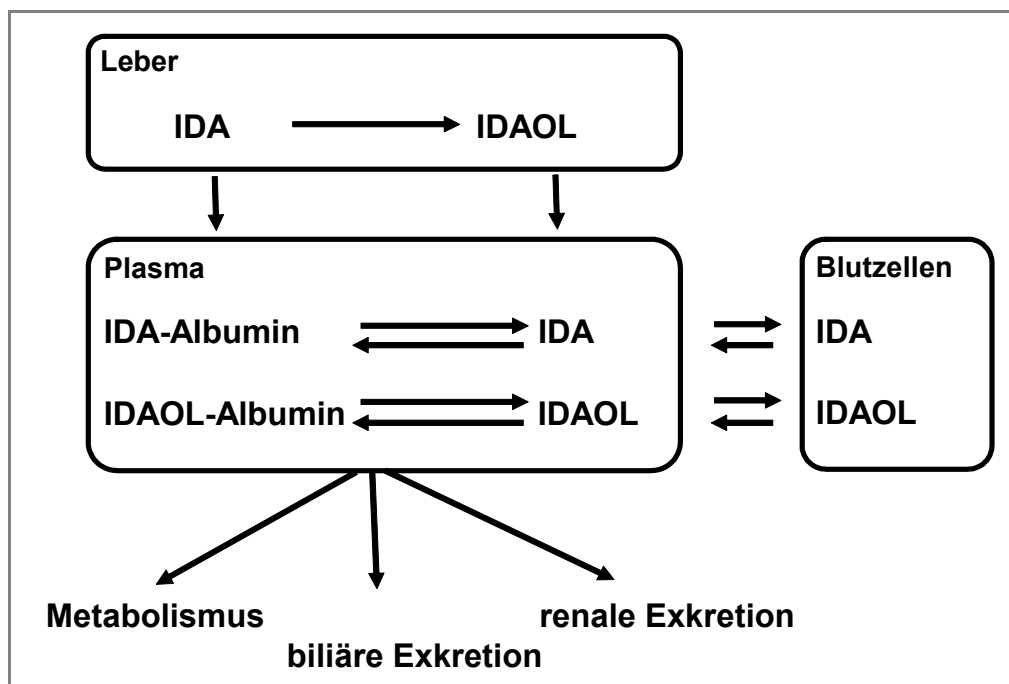


Abb. 3.24: Drei-Kompartiment-Modell von Idarubicin (IDA) und Idarubicinol (IDAOL).

Zusätzlich gibt es Hinweise, die auch auf einen direkten Einfluss der Albumin-Konzentration auf die zelluläre Aufnahme des Idarubicins schließen lassen. In der Arbeit von Kessel *et al.* (2000) wurde die Bedeutung der Serumproteinbindung auf die Aufnahme von Idarubicin in eine humane HL-60-Leukämiezelllinie untersucht. Eine weitere Hypothese für die Erklärung der oben genannten Beobachtung wäre demnach, dass Idarubicin durch die verlängerte Infusionsdauer zu einem größeren

Anteil an die Lipoproteine gebunden wird, als bei der kurzen Infusionsdauer. Die Lipoproteine, sowie das daran gekoppelte Idarubicin, könnten dann über LDL- oder VLDL-Transporter mittels Endozytose in die Zellen gelangen und somit die *intrazelluläre* Akkumulation erhöhen. Chassany *et al.* (1994) zeigten, dass dieser postulierte Aufnahmeweg durchaus möglich ist. Der Mechanismus dieser Zellaufnahme kann gerade bei leukämischen Zellen eine relevante Rolle spielen, da oft eine erhöhte Anzahl an LDL-Rezeptoren exprimiert werden (Wathne *et al.*, 1989). LDL könnte damit als Carrier für Idarubicin in die Zellen dienen. Der genaue Mechanismus konnte in dieser Studie nicht geklärt werden.

3.4.2.3 Tumoransprechen

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie haben insgesamt 55% der Patienten positiv auf die Therapie angesprochen. Geht man davon aus, dass die Höhe der AUC mit der zytotoxischen Effektivität des Zytostatikums korreliert, müsste der Anstieg der AUC in den Zellen, durch die Verlängerung der Infusionsdauer, insgesamt zu einer verbesserten therapeutischen Effizienz geführt haben.

Betrachtete man das Tumoransprechen in Abhängigkeit von der Infusionsdauer, so konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Infusionsgruppen festgestellt werden. In beiden Gruppen gab es jeweils 8 komplette Remissionen und 1 partielle Remission zu verzeichnen.

Betrachtete man stattdessen die *intra-* und *extrazellulären* AUCs in Abhängigkeit vom Ansprechen und der Infusionsdauer, so konnte sowohl ein Trend im Plasma als auch in den Zellen festgestellt werden, der zeigte, dass die kompletten Responder mit der verlängerten Infusionsdauer höhere AUC-Werte erreichten, als die Non-Responder mit der kurzen Infusionsdauer.

Ein Vergleich mit anderen Studien zur Diskussion dieses Aspektes ist nicht möglich, da der klinische Verlauf dort nicht berücksichtigt wurde. Lediglich in einer Studie von Speth *et al.* (1987) zur Untersuchung der *intra-* und *extrazellulären* Pharmakokinetik des Daunorubicins unter Berücksichtigung der Infusionsdauer, wurde von einer ebenfalls unveränderten Remissions-Rate berichtet. In der Studie wurden jedoch nicht die AUC-Werte in Abhängigkeit von der Infusionsdauer und dem Tumoransprechen untersucht. Die meisten der zu diesem Thema durchgeführten Studien beurteilten stattdessen die aufgetretenen Toxizitäten, und hier im speziellen die Kardiotoxizität (Legha *et al.*, 1982; Lum *et al.*, 1985).

Grundsätzlich ist bei der Bewertung des Tumoransprechens zu beachten, dass eine Tumor-Remission auf die Applikation von Idarubicin und/oder auf den Kombinationspartner Cytarabin zurückzuführen ist. Dieses Problem besteht für alle

Kombinationstherapien.

Außerdem können weitere Faktoren, die zunächst von der verabreichten Chemotherapie unabhängig sind, die Wahrscheinlichkeit einer Remission mit beeinflussen. Dazu gehören, neben dem Stadium der Erkrankung, bestimmte Eigenschaften der Tumoren, anhand derer die Prognose des Patienten vorhergesagt werden können.

4 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Da die Chemotherapie nach wie vor das entscheidende Behandlungselement in der Krebstherapie darstellt und die Einführung gänzlich neuer Therapieprinzipien mittelfristig nicht zu erwarten ist, können wichtige Fortschritte in der Therapie maligner Erkrankungen vor allem durch eine Verbesserung der bereits vorhandenen Therapieprotokolle erzielt werden.

Trotz großer Anstrengungen existieren nur für wenige Zytostatika geeignete Strategien zur Therapieoptimierung und -individualisierung, obwohl diese einen wichtigen Beitrag zur Wirksamkeit und Sicherheit der Zytostatika leisten könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Phase-IV-Studien (Irinotecan-Studie und Idarubicin-Studie) zur Therapie maligner Erkrankungen durchgeführt, mit dem Ziel die bisher bestehenden Dosierungsschemata aufgrund pharmakokinetischer und pharmakogenetischer Parameter zu optimieren und individualisieren.

Im Rahmen der Phase-IV-Studie zur Individualisierung der Irinotecan-Therapie, welche als First-line-Standardtherapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird, wurden Untersuchungen zur Bioanalytik, Pharmakokinetik, Pharmakogenetik und Toxizität des Irinotecans durchgeführt. Im Focus der Untersuchungen stand dabei der pharmakogenetische Aspekt.

Ausgehend von literaturbekannten analytischen Methoden, sollte zunächst ein Bestimmungsverfahren für Irinotecan und seine beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G in Humanplasma entwickelt werden. Dazu wurde eine von Poujol *et al.* (2003) beschriebene Methode modifiziert und gemäß den internationalen Anforderungen für Bioanalytik erfolgreich validiert.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Studie die Pharmakokinetik von Irinotecan, SN-38 und SN-38-G an insgesamt 20 Patienten aus drei verschiedenen onkologischen Zentren mit Hilfe eines nicht-kompartimentellen Modells charakterisiert. Die Patienten wurden mit verschiedenen irinotecanhaltigen Kombinationstherapien behandelt, wobei Irinotecan als 90-minütige Infusion in einer Dosierung von 50 – 180 mg/m² verabreicht wurde. Die dabei ermittelten pharmakokinetischen Parameter stimmten im Wesentlichen mit bereits in anderen Studien erhobenen Daten überein. Nach Normierung der erhaltenen Werte auf die verabreichte Dosis und die Körperoberfläche ergaben sich für Irinotecan im Mittel folgende Parameter:

$AUC_{0-\infty} = 40.6 \text{ h/m}^5$, $t_{1/2} = 7.4$ Stunden, $CL = 13.9 \text{ l/h/m}^2$ und $V_z = 146.6 \text{ l/m}^2$. Für den aktiven Metaboliten SN-38 wurden eine mittlere normierte $AUC_{0-\infty}$ von 0.8 h/m^5 und eine Halbwertszeit von 13.2 Stunden ermittelt und für den glukuronidierten Metaboliten SN-38-G ergaben sich eine $AUC_{0-\infty}$ von 2.1 h/m^5 und eine Halbwertszeit von 14.2 Stunden.

Um den Einfluss ausgewählter Polymorphismen auf die Pharmakokinetik der drei betrachteten Analyten untersuchen zu können, wurde eine Genotypisierung der teilnehmenden Patienten durchgeführt. Insgesamt wurden sieben verschiedene Polymorphismen in den Genen von Enzymen und Transportern untersucht, welche an der Biotransformation und Verteilung des Irinotecans beteiligt sind. Dazu gehörten Polymorphismen des P-Glykoproteins (C1236T und C3435T), des OATP-C-Transporters (A388G, T521C, G721A und OATP-C*15) und des UGT1A1-Enzyms (UGT1A1*28). Während in der Literatur Untersuchungen zu den Polymorphismen des P-Glykoproteins und des UGT1A1-Enzyms bereits zu finden sind, sollte im Rahmen der hier durchgeführten Studie erstmals der Einfluss der Polymorphismen des OATP-C-Transporters auf die Irinotecan-Pharmakokinetik *in vivo* untersucht werden.

Die Analyse der Pharmakokinetik, unter besonderer Berücksichtigung dieser OATP-C-Polymorphismen, ergab in dieser Arbeit weder für Irinotecan noch für seine beiden Metaboliten SN-38 und SN-38-G einen signifikanten Unterschied für die ermittelten Genotypen. So erreichten z.B. die Träger der Doppelmutation OATP-C*15 eine mittlere normierte $AUC_{0-\infty}$ von 44.5 h/m^5 für Irinotecan, von 0.6 h/m^5 für SN-38 und von 1.6 h/m^5 für SN-38-G, während die Träger des Referenzgenotyps OATP-C*1a Werte von 41.1 h/m^5 und 0.8 h/m^5 und 1.9 h/m^5 aufwiesen. In einer zeitgleich durchgeführten Studie von Xiang *et al.* (2006) mit einer asiatischen Population konnten jedoch signifikante Unterschiede für alle drei Analyten evaluiert werden. Eine Erklärung findet die Diskrepanz der Ergebnisse beim Vergleich der Genotyp- und Allel-Frequenzen der beiden Patienten-Populationen, die sich in ihrer Verteilung signifikant unterscheiden. In der asiatischen Population wiesen nur 8% der Patienten den Referenzgenotyp auf, während dieser in der kaukasischen Population mit 30% detektiert werden konnte. Die therapielevanten Genotypen und die daraus abzuleitenden klinischen Therapieempfehlungen unterscheiden sich in diesem Fall je nach Ethnizität. Während eine Dosisindividualisierung für die asiatische Population in Betracht gezogen werden könnte, ergeben sich keine Änderungen für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte kaukasische Population.

Für die anderen in der vorliegenden Studie untersuchten Polymorphismen, ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede für die Irinotecan-Pharmakokinetik. Es

wurden jedoch Trends ersichtlich, welche die bisher bestehenden Erkenntnisse größtenteils stützen. Insgesamt betrachtet scheinen die untersuchten Polymorphismen des P-Glycoproteins keinen starken Einfluss auf die Irinotecan-Pharmakokinetik in Kaukasiern zu haben, so dass eine weitere pharmakogenetische Untersuchung nicht notwendig erscheint. Die Untersuchung des UGT1A1*28-Polymorphismus sollte jedoch in die Routine aufgenommen werden, da dessen Einfluss auf die Irinotecan-Pharmakokinetik in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte und die Ergebnisse dieser Studie diese ebenfalls untermauern.

Pharmakogenetische Dosierungsempfehlungen sind nur einer unter vielen Aspekten zur Individualisierung der Arzneitherapie. Für eine individuelle Behandlung von Patienten müssen ebenso Faktoren wie Alter, Gewicht und Geschlecht des Patienten als mögliche Einflussfaktoren geprüft werden. Diesbezüglich konnte ein signifikanter Zusammenhang der SN-38-AUC und dem Alter evaluiert werden, wobei die klinische Relevanz dieses Ergebnisses noch offen steht.

Die Untersuchung der Toxizität des Irinotecans unter besonderer Berücksichtigung der Pharmakokinetik ergab, dass die Patienten, welche vermehrt unter einer Leukopenie (Grad 1 - 2) oder einer Diarrhö (Grad 2 - 3) zu leiden hatten, etwas höhere mediane SN-38-AUCs zeigten, als die Patienten ohne Toxizitäten. Ob und in welchem Maße ein Polymorphismus hieran beteiligt ist, ließ sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht ermitteln.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Pharmakogenetik im Falle des Irinotecans viele Möglichkeiten bietet, die Therapie individueller an den einzelnen Patienten anzupassen. Jedoch ist die Erweiterung der Untersuchung auf andere genetische Varianten in zukünftigen Studien notwendig.

Im Rahmen der Phase-IV-Studie zur Optimierung der Idarubicin-Therapie, welche vorwiegend in der Behandlung akuter Leukämien eingesetzt wird, wurde erstmals der Einfluss der Infusionsdauer auf die *extra-* und *intrazelluläre* Pharmakokinetik des Idarubicins untersucht. Zu diesem Zweck wurden 33 Leukämie-Patienten mit zwei unterschiedlichen Idarubicin-Infusionsprotokollen (30 Minuten vs. 180 Minuten) behandelt. Alle Patienten erhielten Idarubicin dabei in einer Dosierung von 17.5 mg/m² KOF. Zusätzlich erhielten sie Cytosin-Arabinosid als Hochdosis-Therapie.

Eine Voraussetzung für die pharmakokinetischen Untersuchungen war die Etablierung und Validierung einer Quantifizierungsmethode für Idarubicin und seinen aktiven Metaboliten Idarubicinol in verschiedenen biologischen Matrices.

Die Verlängerung der Infusionsdauer von 30 auf 180 Minuten führte zu signifikant höheren *intra*- und *extrazellulären* Idarubicin-AUCs (17 ng*h/10⁶ Zellen vs. 60 ng*h/10⁶ Zellen und 77 ng*h/ml vs. 126 ng*h/ml). Außerdem wiesen die Patienten mit der kurzen Infusionsdauer eine signifikant höhere renale Clearance auf, als die Patienten mit der verlängerten Infusionsdauer (14 l/h vs. 3 l/h). Die Pharmakokinetik des Metaboliten Idarubicinol blieb durch die Änderung des Infusionsprotokolls unbeeinflusst.

Die AUC einer zytostatisch wirksamen Verbindung stellt ein relativ gutes Maß dar, um deren Einwirkung auf Krebszellen zu erfassen. Bei höheren AUC-Werten wird im Allgemeinen mit einer effektiveren Therapie gerechnet. Diese These wird bestätigt, wenn man die Idarubicin-AUC-Werte der kompletten Responder mit der verlängerten Infusionsdauer mit denen der Non-Responder und der kurzen Infusionsdauer vergleicht (CR + 180 Min. vs. NR + 30 Min.). Sowohl die *extrazellulären*, als auch die *intrazellulären* AUCs der Responder waren höher, als die der Non-Responder. So war z.B. die mediane *intrazelluläre* AUC der Respondergruppe ungefähr um den Faktor 6 höher, als die ermittelte AUC der Non-Respondergruppe (17 ng*h/10⁶ Zellen vs. 108 ng*h/10⁶ Zellen). An dieser Stelle sei angemerkt, dass es sich hierbei um einen Trend handelt.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der in dieser Phase IV-Studie untersucht wurde, ist der Einfluss des Albumin-Spiegels auf die *intra*- und *extrazellulären* AUC-Werte. So bestimmt die Proteinbindung vor allem die freie Konzentration des Pharmakons, die zur Aufnahme in die Zelle zur Verfügung steht. Die Patienten mit normwertigen Albumin-Spiegeln und der verlängerten Infusionsdauer zeigten höhere mediane *intra*- und *extrazelluläre* AUCs, als die Patienten mit niedrigen Albumin-Spiegeln und der kurzen Infusionsdauer (5 ng*h/10⁶ Zellen vs. 60 ng*h/10⁶ Zellen und 70 ng/ml vs. 151 ng/ml). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die Patienten mit den normwertigen Albumin-Spiegeln ein „Depot“ bilden und somit mehr Idarubicin aus diesem Depot in die Zellen abgegeben werden kann. Jedoch handelt es sich hierbei ebenso um einen Trend, da keine statistische Signifikanz erlangt wurde.

Zusammenfassend ergeben sich somit zwei neue Ansatzpunkte für die Optimierung der Idarubicin-Therapie. So ist zum einen die Verlängerung der Infusionsdauer im Hinblick auf die pharmakokinetischen Parameter für die Patienten von Vorteil. Zum anderen sollte der Albumin-Spiegel der Patienten vor der Therapie geprüft werden, da Patienten mit erniedrigtem Albumin-Spiegel Gefahr laufen, eine nicht ausreichend wirksame Therapie zu erhalten.

5 ANHANG

5.1 Beurteilung der Toxizität nach Klassifikation des National Cancer Institute (NCI), „Common Toxicity Criteria“ (CTC), 1999.

Toxizität	Geschlecht	Norm- bereich	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Hämatotoxizität							
Hämoglobin [mg/dl]	M:	14.0-17.5	≥ 11.0	10.0-10.9	8.0-9.9	6.5-7.9	<6.5
	F:	12.3-15.3					
Leukozyten [x10 ⁹ /l]		4.4-11.3	≥ 4.0	3.0-3.9	2.0-2.9	1.0-1.9	<1.0
Thrombozyten [x10 ⁹ /l]		136-409	≥ 100	75-100	50-74.9	25-49.9	<25
Nephrotoxizität							
Kreatinin [mg/dl]	M:	0.5-1.1	0.5-1.1	<1.65	1.65-3.3	3.3-6.6	>6.6
	F:	0.5-0.9	0.5-0.9	<1.35	1.35-2.7	2.7-5.4	>5.4
Hepatotoxizität							
GOT [U/l]	M:	<18	<18	≤ 45	46-90	91-380	>380
	F:	<15	<15	≤ 38	28-75	76-300	>300
GPT [U/l]	M:	<22	<22	≤ 55	56-110	111-440	>440
	F:	<17	<17	≤ 42	43-85	86-340	>340
AP [U/l]	M:	<180	<180	≤ 450	451-900	901-3600	>3600
	F:	<160	<180	≤ 400	401-800	801-3200	>3200

5.2 Materialien

5.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril	LGC Promochem GmbH, Wesel
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose Low Melt	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Campto [®] 20 mg/ml (Irinotecan)	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Dichlormethan	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Ethanol Rotipuran 99.8% (V/V)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Fast Start <i>Taq</i> DNA Polymerase Kit [®] Kitkomponenten: Fast Start <i>Taq</i> DNA Polymerase 10x PCR-Puffer mit MgCl ₂ (10 mM)	Roche-Applied-Science GmbH, Mannheim

PCR Nucleotide Mix, 10 mM	
Gentra Puregene Blut Kit [®]	Biozym Scientific GmbH, Hess.
Kitkomponenten:	Oldendorf
RBC-Lysis Solution	
Cell-Lysis Solution	
Protein Präzipitationslösung	
DNA-Hydratationslösung	
β-Glucuronidase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Glycerol 87%	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Histopaque [®] -1077	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Idarubicinhydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Idarubicinol	Onkologie, Universitätsklinikum Kiel
Isopropanol Rotipuran 99.7% (V/V)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
KOD Hot Start DNA Polymerase Kit [®]	Merck Biosciences KGaA, Darmstadt
Kitkomponenten:	
Hot Start DNA Polymerase	
10x PCR-Puffer	
MgSO ₄ (25 mM)	
dNTPs (jeweils 2 mM)	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumheptansulfonat	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
<i>N,N</i> '-Methylenbisacrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
PCR-Low Ladder Set [®]	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

PCR-Reines Wasser	Roche-Applied-Science GmbH, Mannheim
PCR-Step Ladder, 50 bp [®]	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Oligonukleotide	Jena Bioscience GmbH, Jena
Restriktionsenzyme mit 10x Puffer und 10x BSA (<i>Mbo</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Taq</i> I)	Jena Bioscience GmbH, Jena
RPMI-1640-Medium	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
SN-38	3B Medical Systems Inc., Illinois, USA
Tetrahydrofuran	J.T. Baker, Deventer, Holland
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris-Base 99.9%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Trypan blue solution [®]	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Xylencyanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

5.2.2 Hergestellte Puffer und Lösungen

Acrylamid-Stammlösung 30% (W/V)

Acrylamid	30 g
<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid	0.8 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 100 ml

Agarose-Gel 1.5%

Agarose Low Melt	450 mg
1x TBE-Puffer	30 ml
Ethidiumbromid-Stammlösung	5 µl

Ammoniumperoxodisulfat 10% (W/V)

Ammoniumperoxodisulfat	0.2 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 2 ml

Ethanol 70 % (V/V)

Ethanol 96-100 % (V/V)	70 ml
<i>Aqua bidest.</i>	ad 100 ml

Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid (1 mg/ml)	25
<i>Aqua bidest.</i>	ad 400 ml

Ethidiumbromid-Stammlösung

Ethidiumbromid (1 mg/ml)	1 ml
<i>Aqua bidest.</i>	ad 4 ml

Phosphatpuffer, pH 7

Kaliumdihydrogenphosphat	1.18 g
Dinatriumhydrogenphosphat	4.30 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

Polyacrylamidgel 12%

30% Acrylamid-Stammlösung	40 ml
10x TBE-Puffer	10 ml
<i>Aqua bidest.</i>	49.5 ml
10% Ammoniumperoxodisulfat (W/V)	0.5 ml
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin	40 µl

Probenauftragspuffer für die PCR

50% (V/V) Glycerin	500 µl
0.2% (W/V) SDS	2 mg
0.05% (W/V) Bromphenolblau	1 Krümel
0.05% (W/V) Xylencyanol	1 Krümel
TBE-Puffer, pH 8.3	ad 1000 µl

Reaktionsstopper, pH 3

Acetonitril	48 ml
Methanol	48 ml
HCl 2N	4 ml

10x TBE-Puffer, pH 8.3

1 M Tris-Base	121.14 g
0.85 M Borsäure	52.56 g
10 mM EDTA	3.72 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

1x TBE-Puffer, pH 8.3

10x TBE-Puffer	100 ml
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

5.2.3 Verbrauchsmaterialien

Cellstar [®] -Röhrchen, 15 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Gel-Färbeschale	Nalge Nunc, New York, USA
GELoader [®] -Tips	Eppendorf AG, Hamburg
HPLC Plastic-Vials (700 µl)	Waters Corporation, Massachusetts, USA
Kimtech Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark GmbH, Forchheim
Multi-Adapter (steril)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
PCR-Gefäße (0.5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Pipettenspitzen „safe-seal-tips“	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße, PCR (0.5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
S-Monovetten [®] 7.5 ml KE (1,6 mg K ₂ [EDTA]/ml Blut)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Serologische Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Standard Reaktionsgefäße (1.5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Venofix [®] (steril)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Plastikröhrchen 15 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
SPE Strata-X [®] -Kartuschen, 30 mg/ml	Phenomenex, Aschaffenburg

5.2.4 Geräte

Digitalkamera Sony Cybershot DSC-W12	Sony Corporation, Japan
Gelelektrophorese-Apparatur (mit Zubehör)	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Agagel Mini-Kammer (mit Zubehör)	Biometra GmbH i. L., Göttingen
InoLab pH-Meter pH Level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Kälteumwälzthermostat F 20	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Sartorius [®] Membranfilter (0.45 µm)	Sartorius AG, Göttingen
Sartorius [®] Vakuumfiltrationseinheiten	Sartorius AG, Göttingen
Schüttelwasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, mbH Burgwedel
Spannungsgeber Consort E835	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spektrophotometer Beckmann DU 7500	Beckmann Instruments GmbH, München
Taumelschüttler BEAX	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG
Thermoblock Uno	Biometra GmbH i. L., Göttingen
Transilluminator TI 1	Biometra GmbH i. L., Göttingen
Ultraschallbad Sonorex Super RK 106	Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin
Vortexer VXR	Jahnke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Zentrifuge Mikro 200	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Megafuge [®] 1.0R Heraeus Sepatech; kühlbar	Heraeus Instruments GmbH, Osterode am Harz

6 LITERATURVERZEICHNIS

ABIGERGES D, ARMAND JP, CHABOT GG, DA COSTA L, FADEL E, COTE C, HERAIT P & GANDIA D (1994)
Irinotecan (CPT-11) high-dose escalation using intensive high-dose loperamide to control
diarrhea. *J Natl Cancer Inst*, 86, 446-449.

ABIGERGES D, CHABOT GG, ARMAND JP, HERAIT P, GOUYETTE A & GANDIA D (1995)
Phase I and pharmacologic studies of the camptothecin analog irinotecan administered every
3 weeks in cancer patients. *J Clin Oncol*, 13, 210-221.

ADRIA LABORATORIES (1990)
Idamycin package insert. Columbus, Ohio, USA.

AMEYAW MM, REGATEIRO F, LI T, LIU X, TARIQ M, MOBAREK A, THORNTON N, FOLAYAN GO,
GITHANGA J, INDALO A, OFORI-ADJEI D, PRICE-EVANS DA & MCLEOD HL (2001)
MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly
influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*, 11, 217-221.

AMITAI Y, BHOOMA T & FRISCHER H (1996)
Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency severely restricts the biotransformation of
daunorubicin in human erythrocytes. *J Lab Clin Med*, 127, 588-598.

AML-LEITLINIEN DES WESTDEUTSCHEN TUMORZENTRUMS ESSEN (2005)
<http://www.uni-essen.de/tumorforschung/leitlinien-wtz/aml-ll.html>.

ANDO Y, SAKA H, ANDO M, SAWA T, MURO K, UEOKA H, YOKOYAMA A, SAITOH S, SHIMOKATA K &
HASEGAWA Y (2000)
Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a
pharmacogenetic analysis. *Cancer Res*, 60, 6921-6926.

ARCAMONE F, DI MARCO A, GAETANI M (1961)
Isolamento ed attività antitumorale di un antibiotico da *Streptomyces* sp. *Giornale di
Microbiologica*, 9, 83-90.

AWMF-LEITLINIEN INFORMATIONEN (2005)

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.
<http://www.awmf-leitlinien.de/>, 2005.

BAURAIN R, ZENEBERGH A & TROUET A (1978)

Cellular uptake and metabolism of daunorubicin as determined by high-performance liquid chromatography. Application to L1210 cells. *J Chromatogr*, 157, 331-336.

BENSMINE MA, MARTY M, DE GRAMONT A, BRIENZA S, LÉVI F, DUCREUX M, FRANCOIS E, GAMELIN E, BLEIBER H & CVITKOVIC E (2001)

Factors predicting efficacy of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil (5-FU) ± folinic acid in a compassionate-use cohort of 481 5-FU resistant advanced colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, 85, 509-517.

BIELENBERG J (2001)

Kardiotoxizität von Anthrazyklinen. *Österreichische Apothekerzeitung*, Ausgabe 18.

BINASCHI M, BIGIONI M, CIPOLLONE A, ROSSI C, GOSO C, MAGGI CA, CAPRANICO G & ANIMATI F (2001)

Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 1, 113-130.

BISHOP JF, MATTHEWS JP, YOUNG GA, BRADSTOCK K & LOWENTHAL RM (1998)

Intensified induction chemotherapy with high dose cytarabine and etoposide for acute myeloid leukemia: a review and updated results of the Australian Leukemia Study Group. *Leuk Lymphoma*, 28, 315-327.

BOHLANDER SK (2000)

Fusion genes in leukemia: an emerging network. *Cytogenet Cell Genet*, 91, 52-56.

BOIRON M, WEIL M, JACQUILLAT C, TANZER J, LEVY D, SULTAN C & BERNARD J (1969)

Daunorubicin in the treatment of acute myelocytic leukaemia. *Lancet*, 1, 330-333.

BOKEMEYER C, LIPP HP, MAYER F & KANZ L (1998)

Supportive Maßnahmen bei der Chemotherapie älterer Patienten. *Arzneimitteltherapie*, 16, 140-146.

BOOSER DJ & HORTOBAGYI GN (1994)

Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs*, 47, 223-258.

BORCHMANN P, HUBEL K, SCHNELL R & ENGERT A (1997)

Idarubicin: a brief overview on pharmacology and clinical use. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 35, 80-83.

BOSCH TM, MEIJERMAN I, BEIJNEN JH & SCHELLENS JH (2006)

Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. *Clin Pharmacokinet*, 45, 253-285.

BOYUM A (1968)

Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97, 7.

BUCKLEY MM & LAMB HM (1997)

Oral idarubicin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of haematological malignancies and advanced breast cancer. *Drugs Aging*, 11, 61-86.

CALVERT AH, NEWELL DR, GUMBRELL LA, O'REILLY S, BURNELL M, BOXALL FE, SIDDIK ZH, JUDSON IR, GORE ME & WILTSHAW E (1989)

Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J Clin Oncol*, 7, 1748-1756.

CAMAGGI CM, CARISI P, STROCCHI E & PANNUTI F (1992)

High-performance liquid chromatographic analysis of idarubicin and fluorescent metabolites in biological fluids. *Cancer Chemother Pharmacol*, 30, 303-306.

CATIMEL G, CHABOT GG, GUASTALLA JP, DUMORTIER A, COTE C, ENGEL C, GOUYETTE A, MATHIEU-BOUE A, MAHJOUBI M & CLAVEL M (1995)

Phase I and pharmacokinetic study of irinotecan (CPT-11) administered daily for three consecutive days every three weeks in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol*, 6, 133-140.

CERSOSIMO RJ (1992)

Idarubicin: an anthracycline antineoplastic agent. *Clin Pharm*, 11, 152-67.

CHABOT GG (1997)

Clinical pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Pharmacokinet*, 33, 245-259.

CHABOT GG, ABIGERGES D, CATIMEL G, CULINE S, DE FORNI M, EXTRA JM, MAHJOUBI M, HERAIT P, ARMAND JP, BUGAT R & ET AL. (1995)

Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan (CPT-11) and active metabolite SN-38 during phase I trials. *Ann Oncol*, 6, 141-151.

CHASSANY O, URIEN S, CLAUDEPIERRE P, BASTIAN G & TILLEMENT JP (1994)

Binding of anthracycline derivatives to human serum lipoproteins. *Anticancer Res*, 14, 2353-2355.

CHESTER JD, JOEL SP, CHEESEMAN SL, HALL GD, BRAUN MS, PERRY J, DAVIS T, BUTTON CJ & SEYMOUR MT (2003)

Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*, 21, 1125-1132.

COLLINS FS, BROOKS LD & CHAKRAVARTI A (1998)

A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*, 8, 1229-1231.

CUSACK BJ, YOUNG SP, DRISKELL J & OLSON RD (1993)

Doxorubicin and doxorubicinol pharmacokinetics and tissue concentrations following bolus injection and continuous infusion of doxorubicin in the rabbit. *Cancer Chemother Pharmacol*, 32, 53-58.

DANKS MK, MORTON CL, KRULL EJ, CHESHIRE PJ, RICHMOND LB, NAEVE CW, PAWLIK CA, HOUGHTON PJ & POTTER PM (1999)

Comparison of activation of CPT-11 by rabbit and human carboxylesterases for use in enzyme/prodrug therapy. *Clin Cancer Res*, 5, 917-24.

- DE BRUIJN P, VERWEIJ J, LOOS WJ, NOOTER K, STOTER G & SPARREBOOM A (1997)
Determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 698, 277-285.
- DE JONG FA, DE JONGE MJ, VERWEIJ J & MATHIJSSSEN RH (2006)
Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy. *Cancer Lett*, 234, 90-106.
- DE JONG FA, MATHIJSSSEN RH, XIE R, VERWEIJ J & SPARREBOOM A (2004)
Flat-fixed dosing of irinotecan: influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic variability. *Clin Cancer Res*, 10, 4068-4071.
- DERENDORF H, GRAMATTÉ T & SCHÄFER HG (2002)
Pharmakokinetik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HÄMATOLOGIE UND ONKOLOGIE (2000)
Akute Leukämien. www.dgho.de.
- DEUTSCHE KREBSHILFE E.V. (2004)
Darmkrebs: Ein Ratgeber für Betroffene und Angehörige und Interessierte. *Darmkrebs, Die blauen Ratgeber*, 1. Ausgabe.
- DEUTSCHE KREBSHILFE E.V. (2005)
Leukämie bei Erwachsenen: Ein Ratgeber für Betroffene und Angehörige und Interessierte. *Leukämie, Die blauen Ratgeber*, 6. Ausgabe.
- DODDS HM & RIVORY LP (1999)
The mechanism for the inhibition of acetylcholinesterases by irinotecan (CPT-11). *Mol Pharmacol*, 56, 1346-1353.
- DODDS HM, HAAZ MC, RIOU JF, ROBERT J & RIVORY LP (1998)
Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38. *J Pharmacol Exp Ther*, 286, 578-583.

DU BOIS D & DU BOIS E (1916)

A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Archives of International Medicine*, 17, 863-871.

DUBOST M, GANTER P, MARAL R, NINET L, PINNERT S (1963)

Un nouvel antibiotique à propriétés cytostatiques: la rubidomycine. *C.R. Academie des Sciences (Paris)*, 257,1813-1815.

EFFERTH T & VOLM M (2005)

Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther*, 107, 155-176.

EKSBORG S & NILSSON B (1989)

Reversed-phase liquid chromatographic determination of idarubicin and its 13-hydroxy metabolite in human plasma. *J Chromatogr*, 488, 427-434.

EKSBORG S, BJORKHOLM M, HAST R & FAGERLUND E (1997)

Plasma pharmacokinetics of idarubicin and its 13-dihydro metabolite--a comparison of bolus versus 2 h infusion during a 3 day course. *Anticancer Drugs*, 8, 42-47.

EKSBORG S, SODERBERG M, NILSSON B & ANTILA K (1990)

Plasma pharmacokinetics of Idarubicin and its 13-hydroxymetabolite after intravenous and oral administration under fasting and non-fasting conditions. *Acta Oncol*, 29, 921-925.

ERBAR E (1995)

Onkologie, 2. Auflage, Schattauer: Stuttgart, New York, 113-121.

EVANS WE & MCLEOD HL (2003)

Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*, 348, 538-549.

EVANS WE & RELLING MV (1999)

Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 286, 487-491.

FAUSER A (1997)

Stammzellsystem. Hämatologie/Onkologie. ed. Ostendorf, Urban+Schwarzenberg Verlag.

FDA (2001)

Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. <http://www.FDA.GOV/CDER/Guidance/index.htm>.

FOGLI S, DANESI R, INNOCENTI F, DI PAOLO A, BOCCI G, BARBARA C & DEL TACCA M (1999)

An improved HPLC method for therapeutic drug monitoring of daunorubicin, idarubicin, doxorubicin, epirubicin, and their 13-dihydro metabolites in human plasma. *Ther Drug Monit*, 21, 367-375.

FONG Y, BLUMGART LH & COHEN AM (1995)

Surgical treatment of colorectal metastases to the liver. *CA Cancer J Clin*, 45, 50-62.

FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W, FÖRSTERMANN U & STRAKE K (2001)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl., Urban & Fischer Verlag, Jena, München.

FUKUSHIMA T, KAWAI Y, URASAKI Y, YOSHIDA A, UEDA T & NAKAMURA T (1994)

Influence of idarubicinol on the antileukemic effect of idarubicin. *Leuk Res*, 18, 943-947.

FUKUSHIMA T, UEDA T, UCHIDA M & NAKAMURA T (1993)

Action mechanism of idarubicin (4-demethoxydaunorubicin) as compared with daunorubicin in leukemic cells. *Int J Hematol*, 57, 121-130.

GAGNE JF, MONTMINY V, BELANGER P, JOURNAULT K, GAUCHER G & GUILLEMETTE C (2002)

Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol Pharmacol*, 62, 608-617.

GIESELER F, BIRSACK H, BRIEDEN T, MANDERSCHIED J & NUSSLER V (1994)

Cytotoxicity of anthracyclines: correlation with cellular uptake, intracellular distribution and DNA binding. *Ann Hematol*, 69 Suppl 1, 13-17.

GIESELER F, CLARK M, STIEBELING K, PUSCHMANN M & VALSAMAS S (2000)

Induction of apoptosis by idarubicin: how important is the plasma peak? *Int J Clin Pharmacol Ther*, 38, 217-221.

GILLIES HC, HERRIOTT D, LIANG R, OHASHI K, ROGERS HJ & HARPER PG (1987)

Pharmacokinetics of idarubicin (4-demethoxydaunorubicin; IMI-30; NSC 256439) following intravenous and oral administration in patients with advanced cancer. *Br J Clin Pharmacol*, 23, 303-310.

GOEBEL M, KAPLAN E (1992)

Anthracycline-induced cardiotoxicity - a review. *Onkologie*, 15, 198-204.

GUPTA E, LESTINGI TM, MICK R, RAMIREZ J, VOKES EE & RATAIN MJ (1994)

Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res*, 54, 3723-3725.

HAMAJIMA N, SAITO T, MATSUO K, KOZAKI K, TAKAHASHI T & TAJIMA K (2000)

Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism genotyping. *Jpn J Cancer Res*, 91, 865-868.

HANIOKA N, OZAWA S, JINNO H, ANDO M, SAITO Y & SAWADA J (2001)

Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica*, 31, 687-699.

HANIOKA N, OZAWA S, JINNO H, TANAKA-KAGAWA T, NISHIMURA T, ANDO M & SAWADA JI J (2002)

Interaction of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) with human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*, 30, 391-396.

HECHT JR (1998)

Gastrointestinal toxicity of irinotecan. *Oncology (Williston Park)*, 12, 72-78.

HELLMAN S & VOKES EE (1996) Fortschritte in der herkömmlichen Krebsmedizin. *Spektrum der Wissenschaft*, Ausgabe 13, 59-65.

HERVE F, URIEN S, ALBENGRES E, DUCHE JC & TILLEMENT JP (1994)

Drug binding in plasma. A summary of recent trends in the study of drug and hormone binding. *Clin Pharmacokinet*, 26, 44-58.

HOFFMANN, B. (2003)

Kolorektales Karzinom. CAO-Symposium, Mannheim. *Der Onkologe*, 9, 1148-1151.

HOFFMEYER S, BURK O, VON RICHTER O, ARNOLD HP, BROCKMOLLER J, JOHNE A, CASCORBI I, GERLOFF T, ROOTS I, EICHELBAUM M & BRINKMANN U (2000)

Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3473-3478.

HOLLINGSHEAD LM & FAULDS D (1991)

Idarubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs*, 42, 690-719.

HÖLZEL D, KLAMERT A, SCHMIDT M (1996)

Krebs: Häufigkeiten, Befunde, und Behandlungsergebnisse, ZUCKERSCHWERT: MÜNCHEN.

IKEGAMI T, HA L, ARIMORI K, LATHAM P, KOBAYASHI K, CERYAK S, MATSUZAKI Y & BOUSCAREL B (2002)

Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea. *Cancer Res*, 62, 179-187.

INNOCENTI F, UNDEVIA SD, IYER L, CHEN PX, DAS S, KOCHERGINSKY M, KARRISON T, JANISCH L, RAMIREZ J, RUDIN CM, VOKES EE & RATAIN MJ (2004)

Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol*, 22, 1382-1388.

IYER L, DAS S, JANISCH L, WEN M, RAMIREZ J, KARRISON T, FLEMING GF, VOKES EE, SCHILSKY RL & RATAIN MJ (2002a)

UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J*, 2, 43-47.

IYER L, RAMIREZ J, SHEPARD DR, BINGHAM CM, HOSSFELD DK, RATAIN MJ & MAYER U (2002)

Biliary transport of irinotecan and metabolites in normal and P-glycoprotein-deficient mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, 49, 336-341.

JACQUILLAT C, BOIRON M, WEIL M, TANZER J, NAJEAN Y & BERNARD J (1966)

Rubidomycin. A new agent active in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 2, 27-28.

- JAMROZIAK K, BALCERCZAK E, MLYNARSKI W, MIROWSKI M & ROBAK T (2002)
Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of Polish population. *Pol J Pharmacol*, 54, 495-500.
- KAWATO Y, AONUMA M, HIROTA Y, KUGA H & SATO K (1991)
Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res*, 51, 4187-4191.
- KEHRER DF, SPARREBOOM A, VERWEIJ J, DE BRUIJN P, NIEROP CA, VAN DE SCHRAAF J, RUIJGROK EJ & DE JONGE MJ (2001)
Modulation of irinotecan-induced diarrhea by cotreatment with neomycin in cancer patients. *Clin Cancer Res*, 7, 1136-1141.
- KEHRER DF, YAMAMOTO W, VERWEIJ J, DE JONGE MJ, DE BRUIJN P & SPARREBOOM A (2000)
Factors involved in prolongation of the terminal disposition phase of SN-38: clinical and experimental studies. *Clin Cancer Res*, 6, 3451-3458.
- KERB R, HOFFMEYER S & BRINKMANN U (2001)
ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics*, 2, 51-64.
- KERN W, BEHRE G (2003)
Akute myeloische Leukämien (AML) beim Erwachsenen. *Manual Leukämien: Myelodysplastische und Myeloproliferative Syndrome*, 17-48.
- KESSEL M, GIESELER F & WOODCOCK BG (1999)
Influence of serum protein binding on the uptake and retention of idarubicin by sensitive and multidrug resistant human leukemic cells. *Eur J Clin Pharmacol*, 55, 369-373.
- KESSEL M (2000)
Einfluss der Serumproteinbindung auf die Aufnahme und Retentionskinetik von Idarubicin in eine sensible und resistente humane HL-60 Leukämiezelllinie, Frankfurt, Dissertation.
- KHANNA R, MORTON CL, DANKS MK & POTTER PM (2000)
Proficient metabolism of irinotecan by a human intestinal carboxylesterase. *Cancer Res*, 60, 4725-4728.

KIRCHHEINER J (2004)

Arzneitherapieempfehlungen auf pharmakogenetischer Basis. *Habilitation*.

KIRCHHEINER J, MEISEL C, GOLDAMMER M & GERLOFF T (2003)

Pharmakogenetik als Basis neuer Therapiekonzepte. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung -Gesundheitsschutz*, 10, 835-844.

KLOFT C, JAEHDE U (2003)

Dosisindividualisierung. In: Jaehde U, Radziwill R, Mühlebach A, Schunack W (Hrsg.): *Lehrbuch der Klinischen Pharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 201-223.

KOBAYASHI K, BOUSCAREL B, MATSUZAKI Y, CERYAK S, KUDOH S & FROMM H (1999)

pH-dependent uptake of irinotecan and its active metabolite, SN-38, by intestinal cells. *Int J Cancer*, 83, 491-496.

KOMOTO C, NAKAMURA T, SAKAEDA T, KROETZ DL, YAMADA T, OMATSU H, KOYAMA T, OKAMURA N, MIKI I, TAMURA T, AOYAMA N, KASUGA M & OKUMURA K (2006)

MDR1 haplotype frequencies in Japanese and Caucasian, and in Japanese patients with colorectal cancer and esophageal cancer. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21, 126-132.

KOOLMAN J, RÖHM KH (1998)

Taschenatlas der Biochemie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.

KRATZ F (1995)

Pharmazie in unserer Zeit, 24 (1), 14-26.

KROMIDAS S (1999)

Validierung in der Analytik, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim.

KRÜTH P & WEHLING M (2003)

Pharmakogenomik - Was ist für Internisten relevant? *Internist*, 44, 1524-1530.

KUDOH S, FUKUOKA M, MASUDA N, YOSHIKAWA A, KUSUNOKI Y, MATSUI K, NEGORO S, TAKIFUJI N, NAKAGAWA K, HIRASHIMA T & ET AL. (1995)

Relationship between the pharmacokinetics of irinotecan and diarrhea during combination chemotherapy with cisplatin. *Jpn J Cancer Res*, 86, 406-413.

KUHLMANN O, HOFMANN S & WEISS M (1999)

Determination of idarubicin and idarubicinol in rat plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 728, 279-282.

LAMPE JW, BIGLER J, HORNER NK & POTTER JD (1999)

UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1*28 and UGT1A6*2) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations. *Pharmacogenetics*, 9, 341-349.

LEGHA SS, BENJAMIN RS, MACKAY B, EWER M, WALLACE S, VALDIVIESO M, RASMUSSEN SL, BLUMENSCHNEIN GR & FREIREICH EJ (1982)

Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med*, 96, 133-139.

LI WH & SADLER LA (1991)

Low nucleotide diversity in man. *Genetics*, 129, 513-523.

LI YH, WANG YH, LI Y & YANG L (2006) MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao*, 33, 93-104.

LIPP T, SCHNELLER F, ADORF D, HAFERLACH T, SCHOCH T, SCHLEUNING M (2003)

Akute lymphoblastische Leukämie (ALL) bei Erwachsenen. *Manual Leukämien: Myelodysplastische und Myeloproliferative Syndrome*, 49-76.

LIU LF (1989)

DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem*, 58, 351-375.

LOCKHART AC, TIRONA RG & KIM RB (2003)

Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. *Mol Cancer Ther*, 2, 685-698.

LÜLLMANN H, MOHR K & ZIEGLER A (1990)

Taschenatlas der Pharmakologie, Stuttgart; New York: Thieme.

LUM BL, SVEC JM & TORTI FM (1985)

Doxorubicin: alteration of dose scheduling as a means of reducing cardiotoxicity. *Drug Intell Clin Pharm*, 19, 259-264.

MA MK, ZAMBONI WC, RADOMSKI KM, FURMAN WL, SANTANA VM, HOUGHTON PJ, HANNA SK, SMITH AK & STEWART CF (2000)

Pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites SN-38 and APC in children with recurrent solid tumors after protracted low-dose irinotecan. *Clin Cancer Res*, 6, 813-819.

MARCUELLO E, ALTES A, MENOYO A, DEL RIO E, GOMEZ-PARDO M & BAIGET M (2004)

UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*, 91, 678-682.

MARZOLINI C, TIRONA RG & KIM RB (2004)

Pharmacogenomics of the OATP and OAT families. *Pharmacogenomics*, 5, 273-282.

MATHIJSSSEN RH, DE JONG FA, VAN SCHAIK RH, LEPPER ER, FRIBERG LE, RIETVELD T, DE BRUIJN P, GRAVELAND WJ, FIGG WD, VERWEIJ J & SPARREBOOM A (2004)

Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. *J Natl Cancer Inst*, 96, 1585-1592.

MATHIJSSSEN RH, LOOS WJ, VERWEIJ J & SPARREBOOM A (2002)

Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan. *Curr Cancer Drug Targets*, 2, 103-123.

MATHIJSSSEN RH, MARSH S, KARLSSON MO, XIE R, BAKER SD, VERWEIJ J, SPARREBOOM A & MCLEOD HL (2003)

Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res*, 9, 3246-3253.

MATHIJSSSEN RH, VAN ALPHEN RJ, VERWEIJ J, LOOS WJ, NOOTER K, STOTER G & SPARREBOOM A (2001)

Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res*, 7, 2182-2194.

Mathijssen RH, Verweij J, de Jonge MJ, Nooter K, Stoter G & Sparreboom A (2002a)

Impact of body-size measures on irinotecan clearance: alternative dosing recommendations. *J Clin Oncol*, 20, 81-87.

MENDENHALL WM, BLAND KI, COPELAND EM, SUMMERS GE, PFAFF WW, SOUBA WW & MILLION RR (1992)

Does preoperative radiation therapy enhance the probability of local control and survival in high-risk distal rectal cancer? *Ann Surg*, 215, 696-705; discussion 705-706.

MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G & GIANNI L (2004)

Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56, 185-229.

MÜHLHARDT C (2003)

Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 4. Auflage, München: Spektrum Akad. Verlag.

MUTSCHLER E, GEISSLINGER G, KROEMER HK & SCHÄFER-KORTING M (2001)

Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

NAGAR S & REMMEL RP (2006)

Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*, 25, 1659-1672.

NOWELL PC (1976)

The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, 23-28.

NOZAWA T, MINAMI H, SUGIURA S, TSUJI A & TAMAI I (2005)

Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos*, 33, 434-439.

NOZAWA T, NAKAJIMA M, TAMAI I, NODA K, NEZU J, SAI Y, TSUJI A & YOKOI T (2002)

Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 804-813.

NUSSBAUM RL, MCINNES R, HUNTINGTON FW (2001)

Genetic Variation in Individuals: Mutation and Polymorphism, Nussbaum, RL, Ed, Thompson & Thompson Genetics in medicine, W.B. Saunders, Philadelphia, 79-94.

OLSON RD & MUSHLIN PS (1990)

Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *Faseb J*, 4, 3076-86.

OLSON RD, BOERTH RC, GERBER JG & NIES AS (1981)

Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. *Life Sci*, 29, 1393-1401.

PANNUTI F, CAMAGGI CM, STROCCHI E, COMPARSI R, ANGELELLI B & PACCIARINI MA (1986)

Low dose oral administration of 4-demethoxydaunorubicin (idarubicin) in advanced cancer patients. A pharmacokinetic study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 16, 295-299.

PAOLUZZI L, SINGH AS, PRICE DK, DANESI R, MATHIJSSSEN RH, VERWEIJ J, FIGG WD & SPARREBOOM A (2004)

Influence of genetic variants in UGT1A1 and UGT1A9 on the in vivo glucuronidation of SN-38. *J Clin Pharmacol*, 44, 854-860.

PAUL C, TIDEFELT U, LILJEMARK J & PETERSON C (1989)

Increasing the accumulation of daunorubicin in human leukemic cells by prolonging the infusion time. *Leuk Res*, 13, 191-196.

PITOT HC, GOLDBERG RM, REID JM, SLOAN JA, SKAFF PA, ERLICHMAN C, RUBIN J, BURCH PA, ADJEI AA, ALBERTS SA, SCHAAF LJ, ELFRING G & MILLER LL (2000)

Phase I dose-finding and pharmacokinetic trial of irinotecan hydrochloride (CPT-11) using a once-every-three-week dosing schedule for patients with advanced solid tumor malignancy. *Clin Cancer Res*, 6, 2236-2244.

PLATEL D, POUNA P, BONORON-ADELE S & ROBERT J (1999)

Comparative cardiotoxicity of idarubicin and doxorubicin using the isolated perfused rat heart model. *Anticancer Drugs*, 10, 671-676.

POUJOL S, PINGUET F, MALOSSE F, ASTRE C, YCHOU M, CULINE S & BRESSOLLE F (2003)

Sensitive HPLC-fluorescence method for irinotecan and four major metabolites in human plasma and saliva: application to pharmacokinetic studies. *Clin Chem*, 49, 1900-1908.

RATAIN MJ (2002)

Irinotecan dosing: does the CPT in CPT-11 stand for "Can't Predict Toxicity"? *J Clin Oncol*, 20, 7-8.

Rehak PH (1998)

Auswertung und Präsentation experimenteller Daten. *Acta Chir Austriaca*, 30 (Suppl. 147), 29-32.

REID JM, PENDERGRASS TW, KRAILO MD, HAMMOND GD & AMES MM (1990)

Plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid concentrations of idarubicin and idarubicinol in pediatric leukemia patients: a Childrens Cancer Study Group report. *Cancer Res*, 50, 6525-6528.

RHODEN W, HASLETON P & BROOKS N (1993)

Anthracyclines and the heart. *Br Heart J*, 70, 499-502.

RIVORY LP (2000)

Metabolism of CPT-11. Impact on activity. *Ann N Y Acad Sci*, 922, 205-215.

ROBERT J & GIANNI L (1993a)

Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surv*, 17, 219-252.

ROBERT J & RIVORY L (1998)

Pharmacology of irinotecan. *Drugs Today (Barc)*, 34, 777-803.

ROBERT J (1993) Clinical pharmacokinetics of idarubicin. *Clin Pharmacokinet*, 24, 275-288.

ROBERT J, RIGAL-HUGUET F, HUET S, PRIS J & HURTELOUP P (1990)

Pharmacokinetics of idarubicin after oral administration in elderly leukemic patients. *Leukemia*, 4, 227-229.

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2006)

Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. <http://www.rki.de>.

ROOTS I, GERLOFF T, MEISEL C, KIRCHHEINER J, GOLDAMMER M, KAISER R, LASCHINSKI G, BROCKMOLLER J, CASCORBI I, KLEEBERG U & HILDEBRANDT AG (2004)

Pharmacogenetics-based new therapeutic concepts. *Drug Metab Rev*, 36, 617-638.

ROTHENBERG ML, KUHN JG, SCHAAF LJ, RODRIGUEZ GI, ECKHARDT SG, VILLALONA-CALERO MA, RINALDI DA, HAMMOND LA, HODGES S, SHARMA A, ELFRING GL, PETIT RG, LOCKER PK, MILLER LL & VON HOFF DD (2001)

Phase I dose-finding and pharmacokinetic trial of irinotecan (CPT-11) administered every two weeks. *Ann Oncol*, 12, 1631-41.

ROUITS E, BOISDRON-CELLE M, DUMONT A, GUERIN O, MOREL A & GAMELIN E (2004)

Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. *Clin Cancer Res*, 10, 5151-5159.

SADAHIRO S, SUZUKI T, ISHIKAWA K, YASUDA S, TAJIMA T, MAKUUCHI H, MURAYAMA C & OHIZUMI Y (2001)

Intraoperative radiation therapy for curatively resected rectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 44, 1689-1695.

SAI K, KANIWA N, ITODA M, SAITO Y, HASEGAWA R, KOMAMURA K, UENO K, KAMAKURA S, KITAKAZE M, SHIRAO K, MINAMI H, OHTSU A, YOSHIDA T, SAIJO N, KITAMURA Y, KAMATANI N, OZAWA S & SAWADA J (2003)

Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics*, 13, 741-757.

SAI K, SAEKI M, SAITO Y, OZAWA S, KATORI N, JINNO H, HASEGAWA R, KANIWA N, SAWADA J, KOMAMURA K, UENO K, KAMAKURA S, KITAKAZE M, KITAMURA Y, KAMATANI N, MINAMI H, OHTSU A, SHIRAO K, YOSHIDA T & SAIJO N (2004)

UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther*, 75, 501-515.

SALIBA F, HAGIPANTELLI R, MISSET JL, BASTIAN G, VASSAL G, BONNAY M, HERAIT P, COTE C, MAHJoubi M, MIGNARD D & CVITKOVIC E (1998)

Pathophysiology and therapy of irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in patients with advanced colorectal cancer: a prospective assessment. *J Clin Oncol*, 16, 2745-2751.

SALTZ LB, DOUILLARD JY, PIROTTA N, ALAKL M, GRUIA G, AWAD L, ELFRING GL, LOCKER PK & MILLER LL (2001)

Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. *Oncologist*, 6, 81-91.

SCHAEPPI U, FLEISCHMAN RW & COONEY DA (1974)

Toxicity of camptothecin (NSC-100880). *Cancer Chemother Rep* 3, 5, 25-36.

SCHALHORN A, HEINEMANN V (2001)

Klinische Pharmakologie in der Onkologie. *Manual Supportive Maßnahmen und symptomorientierte Therapie*, Tumorzentrum München.

SCHRIMPF G (HRSG.) (2002)

Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, 3. Auflage, Berlin: Spektrum, Akad. Verlag.

SEKINE I & SAIJO N (2001)

Polymorphisms of metabolizing enzymes and transporter proteins involved in the clearance of anticancer agents. *Ann Oncol*, 12, 1515-1525.

SHAPIRA J, GOTFRIED M, LISHNER M & RAVID M (1990)

Reduced cardiotoxicity of doxorubicin by a 6-hour infusion regimen. A prospective randomized evaluation. *Cancer*, 65, 870-873.

SIEGMUND W, CASCORBI I, WEITSCHIES W & KROEMER HK (2003)

Arzneimitteltransporter. *Internist*, 44, 219-226.

SLATTER JG, SCHAAF LJ, SAMS JP, FEENSTRA KL, JOHNSON MG, BOMBARDT PA, CATHCART KS, VERBURG MT, PEARSON LK, COMPTON LD, MILLER LL, BAKER DS, PESHECK CV & LORD RS, 3RD (2000)

Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients. *Drug Metab Dispos*, 28, 423-433.

SLATTER JG, SU P, SAMS JP, SCHAAF LJ & WIENKERS LC (1997)

Bioactivation of the anticancer agent CPT-11 to SN-38 by human hepatic microsomal carboxylesterases and the in vitro assessment of potential drug interactions. *Drug Metab Dispos*, 25, 1157-1164.

SMITH DB, MARGISON JM, LUCAS SB, WILKINSON PM & HOWELL A (1987)

Clinical pharmacology of oral and intravenous 4-demethoxydaunorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 19, 138-142.

SOTTANI C, TRANFO G, BETTINELLI M, FARANDA P, SPAGNOLI M & MINOIA C (2004)

Trace determination of anthracyclines in urine: a new high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for assessing exposure of hospital personnel. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18, 2426-2436.

SPARREBOOM A, DE JONGE MJ, DE BRUIJN P, BROUWER E, NOOTER K, LOOS WJ, VAN ALPHEN RJ, MATHIJSSSEN RH, STOTER G & VERWEIJ J (1998)

Irinotecan (CPT-11) metabolism and disposition in cancer patients. *Clin Cancer Res*, 4, 2747-2754.

SPETH PA, LINSSEN PC, BOEZEMAN JB, WESSELS HM & HAANEN C (1987)

Leukemic cell and plasma daunomycin concentrations after bolus injection and 72 h infusion. *Cancer Chemother Pharmacol*, 20, 311-5.

SPETH PA, MINDERMAN H & HAANEN C (1989)

Idarubicin v daunorubicin: preclinical and clinical pharmacokinetic studies. *Semin Oncol*, 16, 2-9.

SPETH PA, VAN DE LOO FA, LINSSEN PC, WESSELS HM & HAANEN C (1986)

Plasma and human leukemic cell pharmacokinetics of oral and intravenous 4-demethoxydaunomycin. *Clin Pharmacol Ther*, 40, 643-649.

STEWART DJ, GREWAAL D, GREEN RM, VERMA S, MAROUN JA, REDMOND D, ROBILLARD L & GUPTA S (1991)

Bioavailability and pharmacology of oral idarubicin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 27, 308-314.

TAMASSIA V, PACCIARINI MA, MORO E, PIAZZA E, VAGO G & LIBRETTI A (1987)

Pharmacokinetic study of intravenous and oral idarubicin in cancer patients. *Int J Clin Pharmacol Res*, 7, 419-426.

TAN C, TASAKA H (1965)

Clinical studies of daunomycin. *Abstract 253, Proceedings of the American Association of Cancer Research*, 6, 64.

TESTAI E (2001)

The drug-metabolizing enzymatic system and the experimental tools used for in vitro toxicology for metabolic studies. *Cell Biol Toxicol*, 17, 271-285.

TIDEFELT U, SUNDMAN-ENGBERG B & PAUL C (1989)

Comparison of the intracellular pharmacokinetics of doxorubicin and 4'-epi-doxorubicin in patients with acute leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*, 24, 225-229.

TIRONA RG, LEAKE BF, MERINO G & KIM RB (2001)

Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem*, 276, 35669-35675.

TOFFOLI G, CECCHIN E, CORONA G & BOIOCCHI M (2003)

Pharmacogenetics of irinotecan. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 3, 225-237.

TUKEY RH, STRASSBURG CP & MACKENZIE PI (2002)

Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases and irinotecan toxicity. *Mol Pharmacol*, 62, 446-450.

TUMORZENTRUM FREIBURG (2006)

Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Kolorektales Karzinom. [http:// www.uniklinik-freiburg.de / tumorzentrum / live / Medizin-Info / Leitlinien / kolorekta_karzinom.pdf](http://www.uniklinik-freiburg.de/tumorzentrum/live/Medizin-Info/Leitlinien/kolorekta_karzinom.pdf).

UNVERFERTH DV, MAGORIEN RD, LEIER CV & BALCERZAK SP (1982)

Doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev*, 9, 149-164.

VAN DEN BONGARD HJ, MATHOT RA, BEIJNEN JH & SCHELLENS JH (2000)

Pharmacokinetically guided administration of chemotherapeutic agents. *Clin Pharmacokinet*, 39, 345-367.

VEERING BT, BURM AG, SOUVERIJN JH, SERREE JM & SPIERDIJK J (1990)

The effect of age on serum concentrations of albumin and alpha 1-acid glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol*, 29, 201-206.

VERWEIJ J & SCHELLENS JH (1995)

Topoisomerase I inhibition: a new target or new missiles? *Ann Oncol*, 6, 102-104.

VOGELSTEIN B, FEARON ER, HAMILTON SR, KERN SE, PREISINGER AC, LEPPERT M, NAKAMURA Y, WHITE R, SMITS AM & BOS JL (1988)

Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319, 525-532.

WATHNE KO, CARLANDER B, NORUM KR & BLOMHOFF R (1989)

Uptake of retinyl ester in HL-60 cells via the low-density-lipoprotein-receptor pathway. *Biochem J*, 257, 239-244.

WEHMEIER A, LÖFFEL J (2001)

Einteilung der Leukämien: Epidemiologie und Prognose. *Innovartis*, 3, 5-11.

WEISS L & MAYHEW E (1985)

An approach to the therapy of metastases from cancer of the upper rectum: a working hypothesis. *Cancer Drug Deliv*, 2, 19-33.

WHO (2000)

Tumors of the digestive System. *WHO Classification of Tumors*, Eds. Hamilton, S.R.; Altonen, L.A., IARC press Lyon.

WILKE HW (2000)

Kombination mit Irinotecan – die Referenztherapie in der First-line-Therapie des fortgeschrittenen Kolorektalkarzinoms. *Onkologie*, 23, 32-34.

WOUTERS KA, KREMER LC, MILLER TL, HERMAN EH & LIPSHULTZ SE (2005)

Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol*, 131, 561-578.

XIANG X, RAO JADA S, HUA LI H, FAN L, SAN THAM L, ING WONG C, CHIN LEE S, LIM R, YU ZHOU Q, CHER GOH B, HUAT TAN E & CHOWBAY B (2006)

Pharmacogenetics of SLCO1B1 gene and the impact of *1b and *15 haplotypes on irinotecan disposition in Asian cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*, 16, 683-691.

YALCIN S, OKSUZOGLU B, TEKUZMAN G, ENGIN H, CELIK I, TURKER A, BARISTA I, GULLU I, GULER N, ALTUNDAG K, OZISIK Y & KARS A (2003)

Biweekly irinotecan plus bolus 5-fluorouracil and folinic acid in patients with advanced stage colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 33, 580-583.

ZEMAN SM, PHILLIPS DR & CROTHERS DM (1998)

Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11561-5.

ZHOU Q, SPARREBOOM A, TAN EH, CHEUNG YB, LEE A, POON D, LEE EJ & CHOWBAY B (2005)

Pharmacogenetic profiling across the irinotecan pathway in Asian patients with cancer. *Br J Clin Pharmacol*, 59, 415-424.

ZINI G, VICARIO GP, LAZZATI M & ARCAMONE F (1986)

Disposition and metabolism of [14-14C] 4-demethoxydaunorubicin HCl (idarubicin) and [14-14C]daunorubicin HCl in the rat. A comparative study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 16, 107-115.

ZUCKER SD, QIN X, ROUSTER SD, YU F, GREEN RM, KESHAVAN P, FEINBERG J & SHERMAN KE (2001)
Mechanism of indinavir-induced hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12671-12676.

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von

HD Dr. Thomas Kunze

Die Herstellung dieser Arbeit war ein langwieriger und mühseliger Prozess und wäre ohne die Mithilfe und Unterstützung vieler Personen in dieser Form nicht zustande gekommen.

Von den vielen, denen ich Dank schulde, möchte ich an erster Stelle meine Doktorväter HD Dr. Thomas Kunze und Prof. Dr. Frank Gieseler nennen. Ihnen danke ich besonders herzlich für ihre Bereitschaft, meine Promotion zu betreuen und die mir stets erwiesene Förderung sowie für die Überlassung des spannenden und aktuellen Themas. Sie ermöglichten eine intensive klinisch-pharmazeutische Zusammenarbeit, die durch großen Freiraum auf der einen Seite und richtungsweisende Ratschläge auf der anderen Seite geprägt war.

In diesem Sinne möchte ich mich auch ganz herzlich bei Prof. Dr. Bernd Clement für seine stete Diskussionsbereitschaft in und außerhalb der Laborbesprechungen und für die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis bedanken.

Dem gesamten Arbeitskreis sei schon mal an dieser Stelle für das harmonische Miteinander gedankt.

Ausdrücklicher Dank gebührt natürlich den Patienten, die im Zentrum dieser Arbeit stehen und die durch ihre bereitwillige Teilnahme diese Studien erst ermöglicht haben. Auch den beteiligten onkologischen Zentren möchte ich an dieser Stelle für ihre Kooperation und Hilfsbereitschaft danken. Mein besonderer Dank richtet sich hier im Speziellen an Schwester Birgit und Schwester Martina der Praxis Bolouri, an Schwester Elke und Schwester Katharina der onkologischen Tagesklinik der Uniklinik Kiel und an Frau Thiessen aus der Praxis Plaumann.

Für die geduldige Beantwortung vieler statistischer Probleme und die Bereitstellung der dazu notwendigen Lektüre möchte ich Herrn Dr. Girreser herzlich danken. Arne Herzog und Detlef Rödiger sei für Ihre kompetente Hilfe bei jeglichen Computerproblemen gedankt. Bei Sven Wichmann bedanke ich mich für die Beantwortung vieler die HPLC betreffender Fragen und die prompte Hilfe bei technischen Problemen jeglicher Art. Besonders bedanke ich mich bei Christine und Mike für die engagierte Hilfe bei meinen Ausflügen in die Welt der Caco-Zellen und die netten Unterhaltungen im Labor zwischendurch.

Für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 8. Semesters bedanke ich mich bei Fredi, Uwe, Meike, Helen, Lars, Katrin, Melissa und Uli.

Eine große Hilfe bei der Beseitigung von Tippfehlern und unglücklichen Formulierungen waren Antje (ohne Dich hätte ich das nie geschafft), Ulrike, Meike, Stephi und Christiane. Vielen Dank dafür!

Schließlich geht ein riesengroßes Dankeschön an meine Unimädels, deren Freundschaft mir

sehr viel bedeutet. Ihr habt mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und tapfer meine Heulereien ertragen. Die schönen, geselligen Momente mit Euch waren für mich sehr bereichernd und wertvoll und ich hoffe, dass wir das auch in Zukunft schaffen werden (Stichwort Tagungstourismus).

In diesem Zusammenhang auch noch ein ganz dickes Dankeschön an die Bergamo-Truppe, ohne Eure seelische Unterstützung hätte ich das nicht geschafft.

Bei Antje, Heike und dem Rest der PharmaConvention möchte ich mich für unsere enge Freundschaft über die letzten Jahre bedanken. Leute, Ihr seid super!

All meinen lieben Freunden außerhalb des Institutes, die mich mit vielen tollen Freizeitaktivitäten immer wieder aus dem Unistress rausgeholt haben und mich so immer wieder aufgebaut haben ein ganz großes Dankeschön.

Hilke und Heinz danke ich für Ihr großes Interesse an meiner Arbeit und das stete Daumendrücken. Elisabeth und Erwin ein riesen Dank dafür, dass sie mich drei schöne Jahre bei sich wohnen lassen haben und dass sie mich die ganze Zeit verwöhnt haben.

Besonders Dietmar muss ich ausdrücklichst meine Hochachtung für die Geduld mit meinen Stimmungsschwankungen während der Promotion aussprechen. Du hast mir immer Mut gemacht und mich darin unterstützt, meinen Weg zu gehen und mir dabei immer liebevoll zur Seite gestanden – danke für das Vertrauen in mich.

Zuletzt möchte ich meiner tollen Familie danken. Eure Liebe und Eure Ermutigungen haben mir jederzeit einen großen Rückhalt gegeben. Ein besonderer Gruß geht hier an meine Oma Else, die sicherlich sehr stolz gewesen wäre.

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Familienname	Nina Hoppe
Geburtsdatum	03. November 1976
Geburtsort	Bad Gandersheim
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULAUSSBILDUNG

1983 - 1987	Johann-Wolf-Schule, Nörten-Hardenberg
1987 - 1989	Novalis-Schule, Nörten-Hardenberg
1989 - 1996	Gymnasium Corvinianum, Northeim
Mai 1996	Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM UND AUSBILDUNG

April 1997 - Februar 2001	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 1999	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juni 2001	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juli 2001 - Juni 2002	Praktisches Jahr in der Central-Apotheke, Kiel
August 2002	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
August 2002	Erteilung der Approbation

PROMOTION UND WEITERBILDUNG

Seit Oktober 2002	Wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der Dissertation unter Leitung von PD. Dr. T. Kunze
Seit August 2006	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik

Die Therapieoptimierung und -individualisierung werden in der Onkologie als zwei etablierte Ziele angesehen, da viele Zytostatika eine hohe interindividuelle Variabilität in ihrer Pharmakokinetik aufweisen. Ziel ist es Dosierungsstrategien zu finden, die bei hoher Effektivität der Therapie eine akzeptable Toxizität mit sich bringen. Je nach Zytostatikum bieten sich unterschiedliche Ansatzpunkte an diese Ziele zu verfolgen.

Für die Irinotecan-Therapie, die als First-line-Therapie zur Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird, stellt eine Dosisindividualisierung aufgrund von genetischen Unterschieden einen vielversprechenden Ansatz dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Bioanalytik, Pharmakokinetik, Pharmakogenetik und Toxizität des Irinotecans innerhalb einer Phase-IV-Studie mit 20 Patienten durchgeführt. Darüber hinaus wurden individuelle Patientenfaktoren, wie z.B. Alter, Geschlecht, Gewicht und Körperoberfläche mit der Pharmakokinetik des Irinotecans korreliert.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf dem pharmakogenetischen Aspekt. Neben bereits schon untersuchten Polymorphismen (MDR1: C1236T und C3435T; UGT1A1: UGT1A1*28), wurde erstmals der Einfluss ausgewählter Polymorphismen des OATP-C-Transporters (OATP-C*1b, OATP-C*5 und OATP-C*15) auf die Irinotecan-Pharmakokinetik in einer kaukasischen Patientenpopulation erforscht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit einer asiatischen Patienten-Population, konnten für die Polymorphismen des OATP-C-Transporters in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Irinotecan-Pharmakokinetik festgestellt werden. Ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die anderen untersuchten Polymorphismen.

Ein Ansatz zur Optimierung der Idarubicin-Therapie, welche häufig zur Behandlung akuter Leukämien eingesetzt wird, stellt die Verlängerung der Standardinfusionsdauer dar. Im Rahmen einer Phase-IV-Studie mit 33 Leukämie-Patienten wurden erstmals Untersuchungen zur *intra*- und *extrazellulären* Pharmakokinetik des Idarubicins in Abhängigkeit von der Infusionsdauer durchgeführt, wobei ein Teil der Patienten die Idarubicin-Dosis als 30-minütige und der andere Teil als 180-minütige Infusion erhielt.

Die Verlängerung der Infusionsdauer führte sowohl im Plasma als auch in den untersuchten Blutzellen zu signifikant höheren Idarubicin AUCs. Außerdem zeigten die Patienten mit der schnellen Infusion eine höhere renale Idarubicin-Clearance.

Darüber hinaus ließ sich ein Effekt des Albumin-Spiegels auf die Idarubicin-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von der Applikationsdauer feststellen.

Due to high interpatient pharmacokinetic variability, optimisation and individualisation of therapy are two established objectives in oncology. In order to find drug administration strategies with high efficacy and acceptable toxicity there are different concepts depending on the respective drug.

In the irinotecan-therapy, which is used in the first-line standard therapy of metastatic colorectal carcinoma, dosing individualisation due to genetic variability is a promising approach.

In the present study, investigations were performed regarding bioanalytics, pharmacokinetics, pharmacogenetics and toxicity of irinotecan during a phase-IV-study with 20 colorectal cancer patients, where the pharmacogenetic aspect represented the main focus. In addition individual patient-specific factors such as age, gender, weight and body surface area have been correlated with the irinotecan-pharmacokinetics.

Among other polymorphisms, which have already been investigated in further studies (MDR1: C1236T and C3435T; UGT1A1: UGT1A1*28), the effect of some selected OATP-C polymorphisms (OATP-C*1b, OATP-C*5, OATP-C*15) on irinotecan disposition was determined in Caucasian cancer patients for the first time. In contrast to the results with an Asian patient population, in the present study the examined OATP-C polymorphisms did not influence the irinotecan pharmacokinetics significantly. Equally no significant differences were observed for the other examined polymorphisms.

An approach to improve the treatment with idarubicin, which is often used in the therapy of acute leukaemia, is the prolongation of standard infusion time. During a phase-IV-study with 33 leukaemia patients the extracellular and intracellular pharmacokinetics depending on the application time have been investigated for the first time, whereas 15 patients received idarubicin as a short infusion (30 min) and 18 patients received idarubicin as a prolonged infusion (180 min).

Prolongation of administration-time increased the AUCs of idarubicin in the plasma and in peripheral blood cells significantly. In addition, the median renal clearance of idarubicin was significantly higher in patients receiving the short time infusions.

Moreover an effect of the albumin-level on the idarubicin pharmacokinetics in dependence of the application time was determined.