

**ANALYTIK UND EIGNUNG VON BIOMARKERN  
ZUR VORHERSAGE DER WIRKSAMKEIT VON SUNITINIB  
MIT HILFE VON  
PHARMAKOKINETISCHEN/PHARMAKODYNAMISCHEN  
MODELLEN**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
FRIEDERIKE SARAH KANEFENDT  
aus Lüneburg

Bonn 2012



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde
2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Fuhr

Tag der Promotion: 12. März 2013

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2013



## Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde danke ich für die Überlassung des spannenden und vielseitigen Themas. Sein umfassendes pharmazeutisches Wissen, seine uneingeschränkte Diskussionsbereitschaft und die von ihm gewährten Freiräume hinsichtlich der Projektgestaltung haben maßgeblich zu meiner Entwicklung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Uwe Fuhr danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit bei der Erhebung und Auswertung der sVEGFR-3-Daten und für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Alf Lamprecht und Herrn PD Dr. Stefan Holdenrieder bedanke ich mich ganz herzlich für die Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Ein großer Dank geht an alle Patienten, die in ihrer schweren Situation an der Studie teilgenommen haben.

Für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung und Datenerhebung der C-II-005-Studie bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Klaus Mross, Herrn Prof. Dr. Max Scheulen, Herrn Dr. Richard Fischer und Herrn PD Dr. Dirk Strumberg sowie bei Frau Dr. Berta Moritz und dem Cesar Central Office für die Planung und Organisation der Studie sowie für die freundliche Unterstützung bei offenen Fragen.

Prof. Dr. Fritz Sörgel und Dr. Martina Kinzig danke ich für die Bereitstellung der LC-MS/MS-Methode und für die Quantifizierung von Sunitinib und seines Metaboliten.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern der PK- und Laborgruppe für die vielen Diskussionen, den konstruktiven Gedankenaustausch und die gute Zusammenarbeit. Hauke Rüks möchte ich dabei auch für die vielen bürointernen Diskussionen danken, aus denen ich vieles für das Projekt, aber auch darüber hinaus mitgenommen habe.

Dr. Andreas Lindauer danke ich für die sehr gute Vorarbeit, für die Überlassung seiner Modelle für die Weiterentwicklung in meinem Projekt und für die zuverlässige Unterstützung bei theoretischen und praktischen Fragen insbesondere hinsichtlich NONMEM®.

Hauke Rüks, Dr. Verena Schneider, Valerie Nock und insbesondere Stefanie Kraff und Thomas Cesko danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die konstruktiven Kommentare.

Meinen Kollegen und Freunden des Arbeitskreises Klinische Pharmazie der Universität Bonn danke ich für die schöne gemeinsame Zeit und die immer herrschende gute und fröhliche Stimmung auch über die Arbeitszeit hinaus.

Ein ganz lieber Dank geht an meine Eltern, Geschwister und Großeltern sowie insbesondere an meinen Freund Thomas, die mich fortweiland bei meinen Entscheidungen und auf meinem Weg unterstützt haben und viel Verständnis hatten.

Meiner Familie und lieben Freunden





## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
$\alpha$	Intrinsische Aktivität
AC <sub>ub</sub>	Ungebundene, aktive Konzentration (Sunitinib und SU12662)
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
AUC <sub>SS</sub>	AUC im Steady-State
BL	Basiswert
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Rinderserumalbumin
C <sub>sVEGFR</sub>	Plasmakonzentration von sVEGFR
CL	Clearance
CT	Computertomographie
COX	Cyclooxygenase
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CV	Variationskoeffizient
CWRES	Konditionell gewichtete Residuen
CYP	Cytochrom P450
EBE	Empirische Bayesabschätzungen
EC	Endothelzelle
EC <sub>50</sub>	Konzentration bei halbmaximalem Effekt
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELS	Extended least squares objective function
EMA	European Medicines Agency
Fc	Fragment crystallizable
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälberserum
Flk	Fetal liver kinase

Flt	fms-like tyrosine kinase
FO	First-order estimation
FOCE	First-order conditional estimation
FOLFIRI	Chemotherapie aus Folinat, Fluorouracil und Irinotecan
FOLFOX	Chemotherapie aus Folinat, Fluorouracil und Oxaliplatin
5-FU	Fluorouracil
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GOF	Goodness-of-fit
HAMA	Humane anti-Maus-Antikörper
HIF-1 $\alpha$	Hypoxieinduzierbarer Faktor 1 $\alpha$
HR	Hazard-Ratio
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IIV	Interindividuelle Variabilität
INH	Inhibition
IOV	Interoccasion-Variabilität
IPRED	Individuell vorhergesagte Konzentration
IQR	Interquartilsabstand
IWRES	Individuell gewichtete Residuen
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
k <sub>in</sub>	Bildungsrate nullter Ordnung
k <sub>out</sub>	Eliminationsrate erster Ordnung
KA	Absorptionsgeschwindigkeitskonstante
KDR	Kinase domain region
KI	Konfidenzintervall
$\lambda_0$	Basishazard-Funktion
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie- Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LL	Log-Likelihood
LLOQ	Untere Quantifizierungsgrenze
LRT	Likelihood-Ratio-Test
mBC	Metastasierendes Mammakarzinom
MC	Müllerscher Mischtumors
mCRC	Metastasierendes Kolorektalkarzinom
ME	Mittlerer Vorhersagefehler

MEMS®	Medication Event Monitoring System
Met	N-Desethylsunitinib (SU12662)
mHCC	Metastasierendes Leberzellkarzinom
mMM	Metastasierendes malignes Melanom
MMP	Matrix-Metalloprotease
mNET	Metastasierender neuroendokriner Tumor
mRCC	Metastasierendes Nierenzellkarzinom
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	Mittlere Transitzeit
N	Anzahl der Transitkompartimente
NCA	Nichtkompartimentelle Datenanalyse
NLME	Nichtlineare Modellierung mit gemischten Effekten
NRP	Neuropilin
OBS	Beobachtete Konzentrationen
OF	Objektive Funktion
OFV	Wert der Objektiven Funktion
OS	Gesamtüberlebenszeit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Pharmakodynamik
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor
PFS	Progressionsfreie Überlebenszeit
PK	Pharmakokinetik
4-PL	4-Parameter-logistische Funktion
PRED	Vorhergesagte Konzentration der Population
Q	Interkompartimentelle Clearance
QC-Probe	Qualitätskontrollprobe
RC	Rektumkarzinom
rcf	Relative Zentrifugationsbeschleunigung
RCT	Randomisierte, kontrollierte Studie
RE	Relativer Fehler
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors
RES	Residuum
RMSE	Wurzel aus dem mittleren Quadrat des Vorhersagefehlers, %
RPE	Relativer Vorhersagefehler
RPS	Verhältnis präsystemischer zu systemischer Metabolisierung

SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SIG	Signaltransduktion
SOP	Standard Operating Procedure
Su	Sunitinib
sVEGFR	Löslicher VEGF Rezeptor
$T_{C<x}$	Zeit, in der die Konzentrationen C unterhalb eines bestimmten Wertes x liegt
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TAD	Zeit nach der letzten Dosis
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TTE	Zeit bis zum Ereignis
TTP	Zeit bis zur Progression
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
ub	Ungebunden
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
V	Verteilungsvolumen
VEGF	Vasculärer endothelialer Wachstumsfaktor
VPC	Visual predictive check
WRES	Gewichtete Residuen
WSS	Gewichte Summe der Abweichungsquadrate

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1  Angio- und Lymphangiogenese.....	1
1.2  Tumorangiogenese .....	6
1.3  Sunitinib in der Tumorthherapie .....	7
1.4  Kolorektalkarzinom.....	10
1.5  Biomarker .....	13
1.5.1  Definition und Anwendung.....	13
1.5.2  Biomarkervalidierung .....	14
1.6  Immunoassays zur Biomarkerbestimmung .....	15
1.6.1  Prinzip .....	15
1.6.2  Validierung.....	16
1.7  Pharmakokinetische/Pharmakodynamische Modellierung.....	17
1.7.1  Grundlagen .....	17
1.7.2  Populationspharmakokinetik und -dynamik .....	18
1.7.3  Bedeutung .....	19
1.8  Überlebenszeitanalysen .....	21
2. Zielsetzung .....	23
3. Material und Methoden .....	25
3.1  Materialien .....	25
3.1.1  Chemikalien und Reagenzien.....	25
3.1.2  Lösungen und Puffer .....	26
3.1.3  Verbrauchsmaterialien .....	27
3.1.4  Geräte.....	27
3.1.5  Software.....	28
3.2  Entwicklung und Validierung einer ELISA-Methode zur Quantifizierung von sVEGFR-3 .....	28
3.2.1  Bestimmungsmethode .....	29
3.2.2  Probensammlung und -vorbereitung.....	29
3.2.3  Spezifität, Selektivität und Verdünnungslinearität .....	29
3.2.4  Auswahl der Matrix und Parallelität .....	30
3.2.5  Kalibrierung .....	31
3.2.6  Präzision und Richtigkeit.....	32
3.2.7  Stabilität .....	33
3.2.8  Robustheit .....	33
3.2.9  Anwendbarkeit in klinischen Studien.....	34
3.3  Klinische Studie in Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom.....	35

3.3.1	Zielsetzung .....	35
3.3.2	Studiendesign .....	36
3.3.3	Patienten .....	36
3.3.4	Medikation .....	37
3.3.5	Probenentnahme und -aufbereitung.....	38
3.3.6	Studiendauer .....	39
3.3.7	Zeit bis zur Progression.....	39
3.4	Analytik im Plasma .....	39
3.4.1	Bestimmung von Sunitinib und N-Desethylsunitinib (SU12662) .....	39
3.4.2	Bestimmung von VEGF-A und sVEGFR-2 .....	40
3.4.3	Bestimmung von sVEGFR-3 .....	41
3.4.4	Einfluss der Zentrifugation auf die Quantifizierung der Biomarker ....	43
3.5	PK/PD-Datenanalyse .....	44
3.5.1	Nichtlineare Modellierung mit gemischten Effekten.....	44
3.5.2	Modellentwicklung.....	46
3.5.3	Modellevaluierung .....	48
3.5.4	Sensitivitätsanalyse.....	53
3.6	Pharmakokinetisches Modell .....	54
3.7	Pharmakokinetische/pharmakodynamische Modelle .....	55
3.8	Korrelationsanalyse .....	56
3.9	Simulationsstudie zur optimalen Probeentnahme .....	56
3.10	Überlebenszeitanalysen .....	58
3.10.1	Kaplan-Meier-Analyse .....	59
3.10.2	Proportionales Hazard-Modell .....	61
4.	Ergebnisse.....	67
4.1	Validierung einer ELISA-Methode zur Quantifizierung von sVEGFR-3.....	67
4.1.1	Selektivität und Verdünnungslinearität .....	67
4.1.2	Auswahl der Matrix und Parallelität .....	68
4.1.3	Kalibrierung .....	70
4.1.4	Präzision und Richtigkeit.....	71
4.1.5	Stabilität .....	72
4.1.6	Robustheit .....	72
4.1.7	Anwendbarkeit in der klinischen Praxis.....	75
4.2	Konzentrations-Zeit-Verläufe der Biomarker .....	76
4.2.1	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A .....	76
4.2.2	Löslicher VEGF-Rezeptor 2 .....	79
4.2.3	Löslicher VEGF-Rezeptor 3 .....	82
4.3	Pharmakokinetisches Modell .....	84
4.4	Pharmakokinetische/pharmakodynamische Modelle .....	89

4.4.1	Löslicher VEGF-Rezeptor 2 .....	89
4.4.2	Löslicher VEGF-Rezeptor 3 .....	92
4.5	Korrelationsanalysen .....	93
4.6	Optimale Probenentnahme .....	95
4.7	Überlebenszeitanalysen .....	99
4.7.1	Kaplan-Meier-Analyse .....	99
4.7.2	Cox-Regression.....	101
4.7.3	PK/PD/Time-to-Event-Modell .....	102
5.	Diskussion .....	105
5.1	Validierung der sVEGFR-3-Bestimmungsmethode.....	105
5.2	Probenaufbereitung und Analytik .....	110
5.3	Pharmakokinetik.....	111
5.4	Die löslichen VEGF-Rezeptoren als Biomarker .....	113
5.5	Überlebenszeitanalysen .....	117
5.6	Anwendungsmöglichkeiten.....	123
6.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	127
7.	Zusammenfassung.....	129
8.	Literaturverzeichnis .....	131
Appendix.....		149
Appendix 1 .....		149
Appendix 2a.....		155
Appendix 2b .....		162
Appendix 3 .....		164
Appendix 4 .....		167
Appendix 5 .....		169
Appendix 6 .....		171
Appendix 7 .....		174
Appendix 8 .....		182





# 1. Einleitung

## 1.1 Angio- und Lymphangiogenese

Leonardo Da Vinci war der Erste, der über das Herz-Kreislaufsystem berichtete und dabei die Vermutung äußerte, dass sich die Blutgefäße ähnlich wie das Wurzelwerk eines Baumes ausgehend von einem Stamm (dem Herzen) verzweigen [1]. Heutzutage sind verschiedene Mechanismen der Blutgefäßbildung bekannt, die essentiell für die Nähr- und Sauerstoffversorgung aller Gewebe sind. Die Neubildung des embryonalen Gefäßsystems wird als Vaskulogenese bezeichnet. Bipotente Hämangioblasten differenzieren sich dabei zu Endothel- und hämatopoetischen Zellen. Die Vaskulogenese ist im postnatalen Organismus nur noch von geringer Bedeutung. Die Angiogenese zeichnet sich hingegen durch Aussprossung (*sprouting angiogenesis*) oder Teilung (*intussusception*) bereits bestehender Gefäße nach der Bildung des primären Plexus aus [1,2] und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gefäßsystems und der Bildung der Organe in der Embryonalzeit. In der postnatalen Phase ist die Angiogenese bei Gesunden jedoch auf spezielle physiologische Prozesse begrenzt, zu denen die endochondrale Knochenbildung, bestimmte Stadien des weiblichen Reproduktionszyklus und die Ausbildung der Plazenta während der Schwangerschaft gehören [3,4]. Auch pathologische Prozesse sind direkt mit der Angiogenese assoziiert. Dazu werden die Wundheilung, Ischämien, wie z. B. die zerebrale Ischämie oder der Herzinfarkt, Arteriosklerose, diabetische Retinopathie, Psoriasis, rheumatoide Arthritis und Krebs gezählt [4]. Pro- und antiangiogene Faktoren wirken über verschiedene Wege regulierend auf das Gefäßsystem. Der wohl wichtigste proangiogene Faktor ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), mit seinen Rezeptoren 1 und 2. Des Weiteren spielen das Fibroblasten-Wachstumsfaktor/-Rezeptor- (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) bzw. FGF-2, das DLL4/Notch- (*delta like ligand 4*) und das Angiopoietin/Tie-2-System, der epidermale (*epidermal growth factor*, EGF) und der Blutplättchen-Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor*, PDGF) mit seinen Rezeptoren eine wichtige Rolle [2,4,5]. Zu den antiangiogenen Faktoren gehören Thrombospondin (TSP-1), das die Endothelzellmigration, -proliferation und -adhäsion sowie die Aktivierung der Matrix-Metalloproteasen (MMP) hemmt, sowie Troponin I, das auf die Endothelzellproliferation einwirkt. Ebenso spielen TIMP (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*) und Loop 6, die vor allem für die Hemmung der MMP verantwortlich sind, Angio- sowie Endostatin, die endogene enzymatische

Abspaltungsprodukte von Plasminogen und Kollagen XVIII sind [4], TGF- $\alpha$  und - $\beta$  (*transforming growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*), Angiogenin und IL-8 (Interleukin 8) eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Angiogenese [6]. Die MMP können dagegen sowohl einen positiven als auch negativen Einfluss auf die Angiogenese ausüben, da sie für die Aktivierung pro- und antiangiogener Faktoren verantwortlich gemacht werden [4].

Ausgehend von proangiogenen Signalen kommt es durch MMP zur Degradation der Basalmembran und Teilen der extrazellulären Matrix sowie zur Proliferation und Migration von Endothelzellen in das umgebene Bindegewebe. Die von den MMPs freigesetzten proangiogenen Faktoren, die an Matrixproteine gebunden sind, sorgen für einen Gradienten, entlang dessen die Endothelzellen neue Gefäße bilden. Erreicht der neue Kapillarspross die postkapillare Venole, so wird die Reifung des Gefäßes vorangetrieben, indem glatte Muskelzellen und Perizyten zur Verstärkung angelagert und eine neue Basalmembran ausgebildet werden. Dazu sind weiterhin proangiogene Signale nötig, die die Apoptose des neu entstandenen Gefäßes verhindern. Auch anschließend unterliegen die Blutgefäße fortwährend angiogenen Stimuli, die für eine permanente Umstrukturierung und die Anpassung der Gefäße an den jeweiligen Bedarf sorgen [7].

Das lymphatische System entsteht in der embryonalen Entwicklung nach der Ausbildung und Funktionstätigkeit des kardiovaskulären Systems und ist spezialisiert darauf, Interstitialflüssigkeit, Makromoleküle und paravasilierte Leukozyten aus dem Gewebe aufzunehmen. Neben der Beteiligung vieler Faktoren, wie auch das Angiopoietin/Tie-1- und -2-System, spielt der VEGF-C/VEGFR-3-Pfad eine wichtige Rolle für die Proliferation, Migration und das Überleben der lymphatischen Endothelzellen. Lymphatische Endothelzellen haben, verglichen mit denen der Blutgefäße, nur schwach ausgebildete Kontaktstellen mit häufig vorkommenden interendothelialen Lücken. Die lymphatischen Gefäße sind durch eine unterbrochene Basalmembran sowie durch die fehlende Anlagerung von Perizyten gekennzeichnet [8].

#### *Die Rolle von VEGF und seinen Rezeptoren*

Das VEGF/VEGFR-System stellt einen der wichtigsten Regulationsmechanismen der Vaskulo-, Angio- und Lymphangiogenese dar. VEGF-A, der im Allgemeinen als VEGF bezeichnet wird, gehört derselben Genfamilie an, wie auch der Plazenta-Wachstumsfaktor (*placenta growth factor*, PlGF), VEGF-B, -C, -D und das Orf-Virus-VEGF (VEGF-E) [6]. Über die Rezeptoraktivierung sorgt VEGF für die

Endothelzellproliferation, -migration und deren Überleben. Des Weiteren führt VEGF, der nach der Entdeckung auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor bezeichnet wurde [9], durch Fenestrierung der Endothelzellen zu einer gesteigerten Permeabilität der Gefäße mit einer Potenz, die etwa 50 000-mal stärker als die von Histamin ist [10], sowie zu Gefäßdilatation [3,6]. VEGF und seine Rezeptoren sind essentiell für die normale Entwicklung des Gefäßsystems in der Embryonalzeit. Inaktivierende Mutationen sind bei Mäusen *in utero* letal [11,12]. Verschiedene Isoformen, die durch alternative mRNA-Spleißvarianten gebildet werden, konnten für VEGF-A isoliert werden. Dabei werden vier hauptsächlich vorkommende Isoformen (VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> und VEGF-A<sub>206</sub>) differenziert, die sich in der Anzahl der Aminosäuren sowie in der Basizität und Bindungsaffinität gegenüber Heparin unterscheiden. VEGF-A<sub>121</sub> liegt in frei diffundierbarer Form, VEGF-A<sub>165</sub> sowohl frei als auch an die Zelloberfläche oder die Extrazellulärmatrix gebunden und VEGF-A<sub>189</sub> sowie VEGF-A<sub>206</sub> nur in gebundener Form vor [3,13]. VEGF-A<sub>165</sub> ist dabei am besten verfügbar und dessen hohe mitogene Eigenschaft ist auf die zusätzliche Bindungsaffinität zu Neuropilin-1 (NRP1) zurückzuführen, das als Korezeptor die Effektivität der Signaltransduktion von VEGFR-1 und -2 verbessert (Abb. 1.1) [3]. Der größte Teil der endogenen angiogeneseregulierenden Proteine wird von Thrombozyten sequestriert oder an deren Zelloberfläche gebunden. Somit weisen die  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen auch hohe Konzentrationen an VEGF auf [14]. Einer der wichtigsten Induktoren der VEGF-mRNA-Transkription ist der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe. Eine Hypoxie führt über den hypoxieinduzierbaren Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) zu einer gesteigerten VEGF-Expression [10]. Die Angio- und Lymphangiogenese wird über VEGFR-1 und -2 bzw. über VEGFR-3 vermittelt. Dabei binden die Wachstumsfaktoren der VEGF-Genfamilie mit unterschiedlicher Affinität an die verschiedenen Rezeptoren (Abb. 1.1).

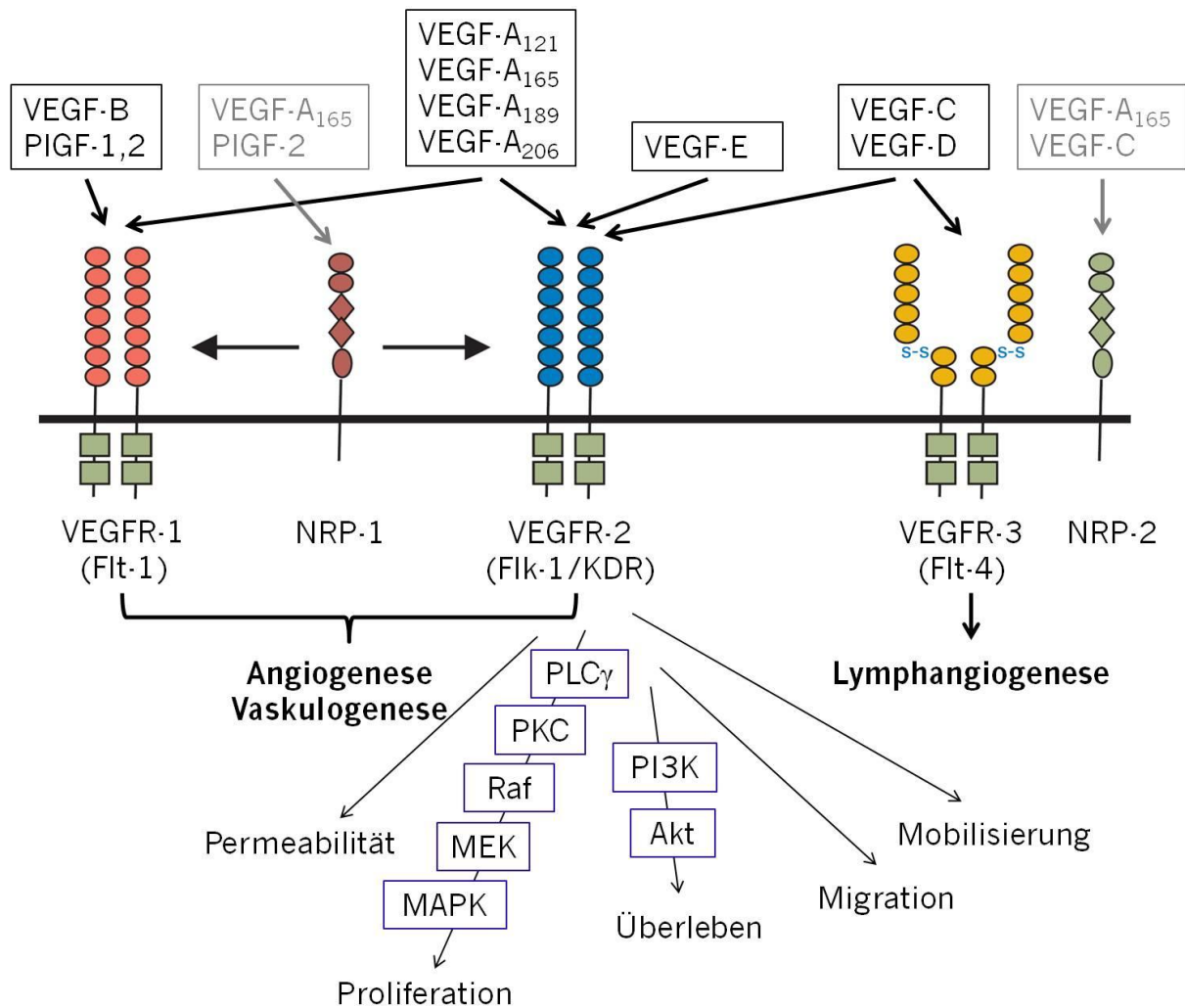


Abb. 1.1 Bindungsspezifität der Wachstumsfaktoren der VEGF-Genfamilie (VEGF-A, -B, -C, -D, -E und der Plazenta-Wachstumsfaktoren (PIGF-1, -2)) zu den entsprechenden VEGF-Rezeptoren (VEGFR) und Korezeptoren (Neuropiline (NRP)) mit dem Signalweg innerhalb einer Endothelzelle und entsprechenden Auswirkungen nach der Aktivierung des VEGFR-2; Abbildung abgeändert nach Hicklin and Ellis 2005 [10] und Kerbel 2008 [5].

Flt: fms-like tyrosine kinase; Flk: fetal liver kinase; KDR: kinase domain region; PLC $\gamma$ : Phospholipase C $\gamma$ ; PKC: Proteinkinase C; Raf: Raf-Kinase; MAPK: mitogene-aktiviert protein kinase, auch ERK: extracellulär signal-reguliert protein kinase; MEK: MAPK kinase, auch MAPKK; PI3K: Phosphatidylinositol 3'-Kinase; Akt: Proteinkinase B

VEGFR-1, -2 und -3, die jeweils auch als *fms-like tyrosine kinase* (Flt-1), *kinase domain region* (KDR, Mensch) oder *fetal liver kinase* (Flk-1, Maus) und Flt-4 bezeichnet werden, sind sich strukturell recht ähnlich, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Funktionen und Expression voneinander [15]. VEGF-A wirkt vor allem durch die

Bindung an VEGFR-2, der auf allen Endothelzellen exprimiert wird [3]. Die Bindungsaffinität zu VEGFR-1 ist etwa zehnfach höher als die zu VEGFR-2, die Signaltransduktion ist allerdings nur sehr schwach [3,5,10]. Es gibt Hinweise, dass die Aktivierung von VEGFR-1 beim Erwachsenen zu einer Signalverstärkung von VEGFR-2 führt, wobei dieser Rezeptor in der Embryonalzeit als negativer Regulator zu agieren scheint [16]. Die genaue Funktion und Rolle von VEGFR-1 beim Erwachsenen ist jedoch weiterhin unklar [15]. Allerdings deuten Untersuchungen darauf hin, dass dessen Funktion abhängig ist vom Entwicklungsstadium, den physiologischen und pathologischen Bedingungen und den Zellen, auf denen der Rezeptor exprimiert ist [10].

VEGFR-3 spielt in der Embryonalentwicklung eine große Rolle in der Vaskulo- und Lymphangiogenese, bei Erwachsenen ist die Expression des Rezeptors jedoch weitestgehend auf die lymphatischen Endothelzellen begrenzt [3]. Eine verminderte Kapazität der Lymphgefäße verbunden mit einer geringeren Expression oder inaktivierenden Mutationen von VEGFR-3 wurde bei Patienten mit Lymphödemen beobachtet [17]. Auf den lymphatischen Endothelzellen ist neben VEGFR-3 auch VEGFR-2 exprimiert, der zur mitogenen und chemotaktischen Signalübertragung beisteuert. Die Affinität von VEGF-C und VEGF-D gegenüber VEGFR-3 steigt bei zunehmendem Grad der proteolytischen Prozessierung. Voll aktivierte Formen beider Wachstumsfaktoren binden und aktivieren ebenfalls VEGFR-2, sodass das Ausmaß der Prozessierung von VEGF-C und -D regulierende Eigenschaften auf das entsprechende angiogene oder lymphangiogene Potential der beiden Wachstumsfaktorrezeptoren hat [8].

Für alle drei Rezeptoren ist ebenfalls eine lösliche Form bekannt [18-21], die als kompetitive Inhibitoren der Liganden oder durch Homo- bzw. Heterodimerisierung mit den zellständigen Rezeptoren regulierende Eigenschaften besitzen [21]. Im Fall des löslichen VEGFR-1 (sVEGFR-1) handelt es sich um eine Spleißvariante [21], die für die Präeklampsie während der Schwangerschaft verantwortlich gemacht wird [22]. Die Herkunft von sVEGFR-2 und -3 ist jedoch weitestgehend unbekannt.

Die verglichen mit den jeweiligen Liganden VEGF-A und -C (Gesunde: ~1 000 - 4 000 pg/mL [23,24]) ~10 - 100-fach höheren Plasmakonzentrationen an sVEGFR-2 und -3 (bezogen auf das Molekulargewicht) sowie die Funktion der Thrombozyten, zirkulierendes VEGF-A aufzunehmen, gewährleistet eine Begrenzung der Angio- und Lymphangiogenese auf kleine Bereiche, wie z. B. die Wundheilung [25,26].

## 1.2 Tumorangiogenese

Schon im späten 19. Jahrhundert wurden Anomalitäten des Koagulationssystems mit Blutungs- und thromboembolischen Ereignissen bei Krebspatienten berichtet [26]. Im Jahr 1971 stellte Judah Folkman die Hypothese auf, dass das Tumorwachstum abhängig von der Angiogenese ist und machte einen Faktor (Tumor-Angiogenese-Faktor), der in tierischen und menschlichen Tumoren mitogen auf die Endothelzellen wirkt und nach heutigen Erkenntnissen dem VEGF entspricht, für seine Beobachtung verantwortlich [27]. Die Ausbildung neuer Gefäße ist damit essentiell, sobald der Tumor eine Größe von  $1 \text{ mm}^3$  erreicht [28]. Der Tumorangiogenese geht der „*angiogenic switch*“ voraus. Ausgelöst durch Hypoxie oder die Mutation von Onko- oder Tumorsuppressorgenen verschiebt sich das im gesunden Individuum bestehende Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren, das eine gesteigerte Angiogenese zur Folge hat [29]. Die Zellen vieler Tumore exprimieren VEGF-A, der zusammen mit dem exprimierten VEGF-A normaler Körperzellen, wie Thrombozyten oder Muskelzellen, stimulierend auf die Endothelzellen wirkt. Zudem weisen jedoch auch viele Tumorzellen selbst die entsprechenden VEGF-Rezeptoren auf, sodass das VEGF-A der Tumorzelle neben der parakrinen Wirkung auch als auto- und sogar intrakriner Wachstumsfaktor dient [5] (Abb. 1.2).

Die erhöhte Expression von VEGF-A in Tumorzellen und das vermehrte Vorkommen von VEGFR-2 in den Endothelzellen der Tumorgefäße sind mit einer gesteigerten Angiogeneseaktivität assoziiert [30]. Im Gegensatz zur physiologischen Angiogenese, in der Gefäße schnell reifen und anschließend stabil sind, wird die Tumorangiogenese schnell initiiert, jedoch teilweise nicht beendet, sodass sie auch als „Wunden, die nie heilen“ [31] bezeichnet werden. Das führt dazu, dass die Tumorgefäße undicht und unreif bleiben, da zum Teil nur wenige Perizyten und glatte Muskelzellen angelagert werden. Die Gefäße sind mehrschichtig, miteinander verbrückt und einer ständigen Umstrukturierung unterlegen. Inter- und transzelluläre Löcher in den Gefäßen führen zu unkontrollierbarer Permeabilität. Es entstehen ungeordnete Gefäßstrukturen, in denen Endothelzellen teilweise gegen Tumorzellen ausgetauscht sind, sodass mosaikartige Strukturen zu erkennen sind [32]. Der Blutfluss ist folglich nicht optimal, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen insbesondere bei schnell wachsenden Tumoren sicher zu stellen. Resultierende Nekrosen und hypoxische Bereiche stimulieren die Bildung weiterer Gefäße [33]. Die gesteigerte Permeabilität der Gefäße lässt einen fast ungehinderten Flüssigkeitsaustausch zwischen Tumor und Interstitium zu. Durch den hohen interstitiellen Druck können

nicht nur Wachstumsfaktoren, sondern auch Tumorzellen entlang des Druckgradienten leichter in die Zirkulation gelangen und zur Metastasierung des Tumors führen [34].

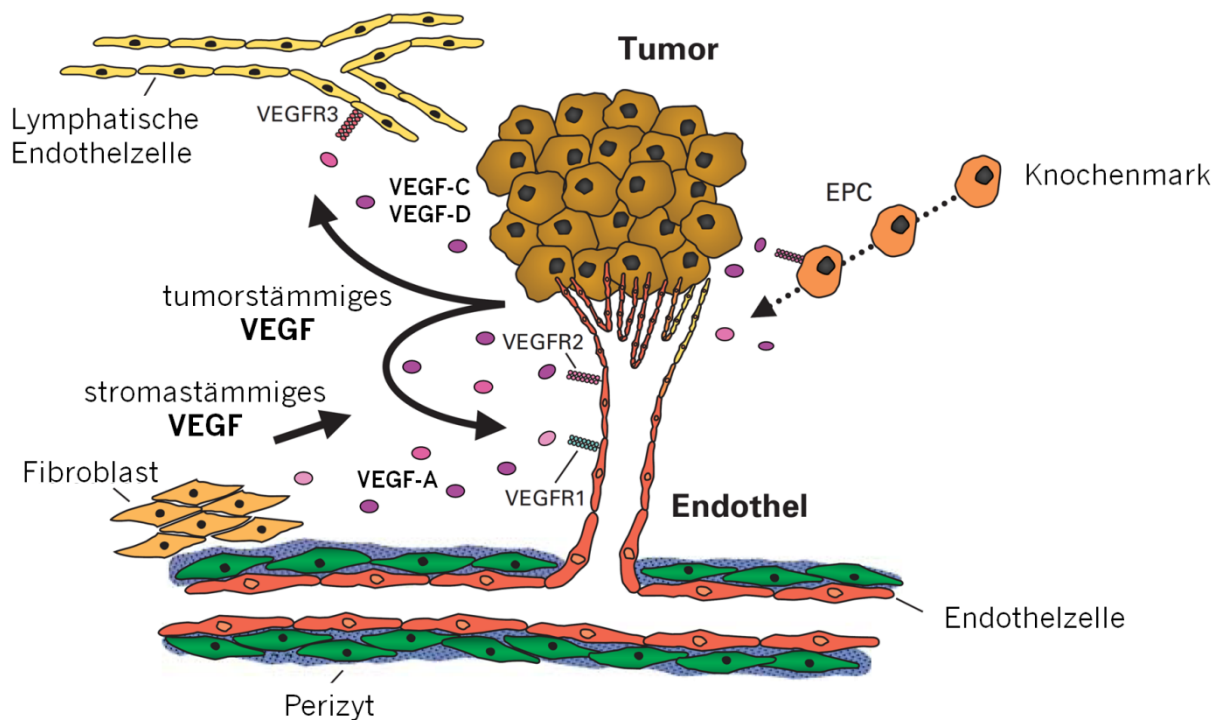


Abb. 1.2 Modell der Rolle des VEGFR in der Tumorangiogenese nach Hicklin et al. [10]. VEGF wird von Tumor- (●) und gesunden Stromazellen (●) exprimiert und stimuliert VEGFR-1, -2 und -3, die auf Endothel-, lymphatischen Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen zu finden sind. Die Signalübertragung durch VEGFR-1 und -2 führt zur Endothelzellproliferation, -migration und zum Endothelzellüberleben sowie zu einer gesteigerten Permeabilität. VEGF-A stimuliert ebenfalls die Rekrutierung von Endothelvorläuferzellen (EPC). VEGF-C und -D stimulieren VEGFR-3-positive lymphatische Endothelzellen und die Lymphangiogenese.

Das Lymphsystem ist einer der häufigsten Wege der initialen Metastasierung. Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF-C, der von vielen Tumorentitäten überexprimiert wird, und der lymphatischen Invasion sowie der Lymphknoten- und der fernen Metastasierung [8].

### 1.3 Sunitinib in der Tumorthherapie

Sunitinib L-Maleat ist ein oraler zielgerichteter Multityrosinkinase-Inhibitor, der eine Oxindol-Struktur aufweist und mit der Summenformel  $C_{22}H_{27}FN_4O_2$  beschrieben werden kann (Abb. 1.3).

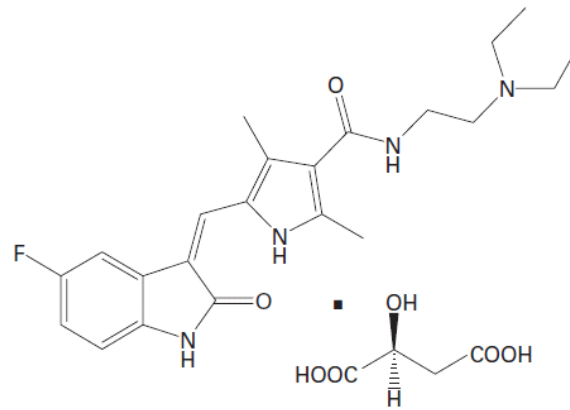


Abb. 1.3 Chemische Struktur von Sunitinib L-Maleat [35].

Die frühere Bezeichnung SU11248 ist ebenfalls geläufig. Die Substanz wurde im Januar 2006 von der *Food and Drug Administration* (FDA) und im Juli 2006 von der *European Medicines Agency* (EMA) zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms (*metastatic renal cell carcinoma*, mRCC) und des Imatinib-resistenten gastrointestinalen Stromatumors (*gastrointestinal stromal tumor*, GIST) zugelassen und wird von der Firma Pfizer Ltd (Kent, UK) unter dem Namen Sutent® vermarktet [33,36]. 2011 wurde die Zulassung in der Indikation metastasierende neuroendokrine Tumore (*metastatic pancreatic neuroendocrine tumor*, pNET) erweitert [36].

Die antiangiogene Wirkung von Sunitinib ist auf die selektive Hemmung verschiedener Tyrosinkinasen, zu denen VEGFR-1, -2 und -3, PDGFR- $\alpha$  und - $\beta$ , der Stammzell-Wachstumsfaktorrezeptor Kit (KIT), FLT3, der Protoonkogen-Tyrosinproteinkinase-Rezeptor Ret (RET) und der Rezeptor 1 des koloniestimulierenden Faktors (*Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor*, CSF1R) gehören, zurückzuführen [33]. Dabei bindet Sunitinib intrazellulär kompetitiv an die Bindungstasche des Adenosintriphosphats (ATP) und hemmt die Phosphorylierung und die Signalübertragung der entsprechenden Rezeptortyrosinkinasen. Fehlende angiogene Signale führen zum Absterben bestehender und hemmen die Bildung neuer Tumorgefäße. Somit werden insbesondere im Inneren des Tumors Nekrosen beobachtet, während die peripheren Tumorzellen oft vital bleiben (Abb. 1.4). Häufig wird daher keine maßgebliche Veränderung der Tumorgöße beobachtet [33]. Eine weitere Hypothese, die von einem mathematischen Modell unterstützt wird, geht davon aus, dass die Therapie mit einer antiangiogenen Substanz zu einer Gefäßnormalisierung führt. Der darauf folgende sinkende interstitielle Druck führt zu einer verbesserten Verteilung von Chemotherapeutika in das Tumorgewebe. Aufgrund des geringeren Druckgradienten kann zudem die Elimination der



chemotherapeutischen Substanzen sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und metastasierenden Tumorzellen aus dem Tumorgewebe eingeschränkt werden [34].

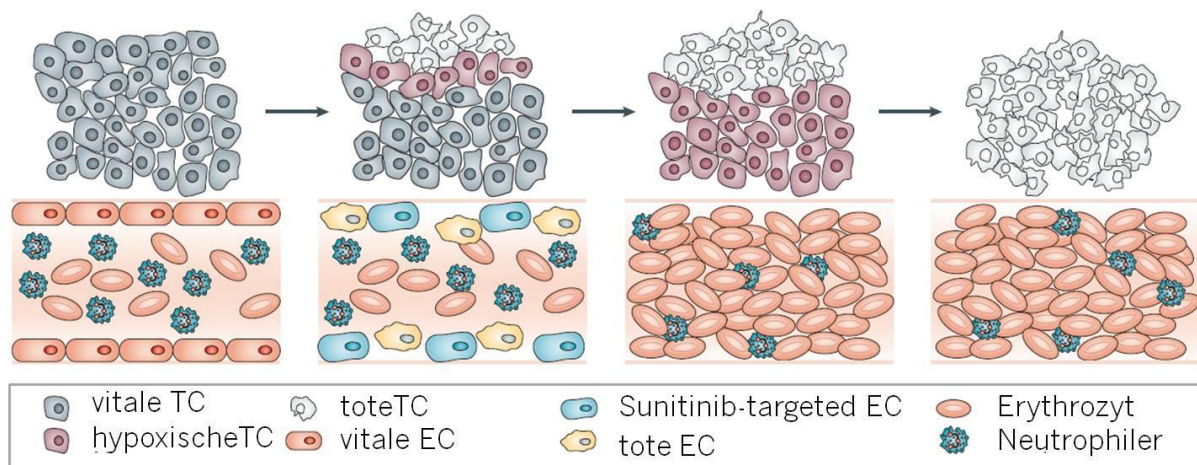


Abb. 1.4 Angenommener Wirkmechanismus der sunitinibinduzierten Tumornekrose. Schrittweiser Untergang der Endothelzellen (EC) führt zu Nekrosen in zentralen Bereichen des Tumors [33].

TC: Tumorzellen

Sunitinib wird nach peroraler Applikation langsam absorbiert. Maximale Konzentrationen werden nach etwa 6 bis 12 h erreicht. Präklinische Untersuchungen an Affen deuten auf einen hohen First-Pass-Effekt hin [37]. CYP3A4 ist das wichtigste Cytochrom P450-Isoenzym für den Metabolismus von Sunitinib und ist zudem verantwortlich für die Bildung des aktiven N-Desethyl-Hauptmetaboliten SU12662, der sich in biochemischen Tyrosinkinase- und Zellproliferationsassays als äquipotent erwies [33]. Beide aktive Substanzen sind mit 95 % (Sunitinib) und 90 % (SU12662) stark an Plasmaproteine gebunden. 50 - 72 % der Dosis werden in den Fäzes und 13 - 20 % im Urin wieder gefunden [37].

Präklinische Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei Gesamtplasmakonzentrationen (Sunitinib + SU12662) zwischen 50 und 100 ng/mL die Hemmung der Zielstrukturen gewährleistet ist [38]. Verschiedene Dosisregime wurden in diesem Zusammenhang untersucht. Dazu gehörte die tägliche Gabe für zwei Wochen mit anschließender einwöchiger Pause (2/1-Schema) [39], das 2/2- und das 4/2-Schema [40] sowie die kontinuierliche Applikation [41-43]. Auf Anraten der Zulassungsbehörde wurde das 4/2-Therapieschema mit einer vierwöchigen täglichen Gabe von 50 mg gefolgt von einer zweiwöchigen Therapiepause in die Zulassungsunterlagen aufgenommen [36,44], um den Patienten eine Erholung von möglichen toxischen Wirkungen zu erlauben [33]. Neuere Ergebnisse einer

vergleichenden Studie bestärken die Überlegenheit des 4/2-Schemas (50 mg) gegenüber der kontinuierlichen Gabe (37,5 mg) [45].

Die auftretenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) weisen in der Regel einen milden bis moderaten Schweregrad auf und unterscheiden sich kaum zwischen den Indikationen [33]. Die häufigsten, nicht-hämatologischen UAW sind Fatigue, gastrointestinale Toxizität (Diarrhö, Verstopfung, Übelkeit, Erbrechen, Mukositis/Stomatitis, Dyspepsien), Hypertonie, periphere Ödeme, Anorexie, trockene Haut und Verfärbungen der Haut sowie das Hand-Fuß-Syndrom. Zu den schwerwiegenden UAW gehören Hepatotoxizität, linksventrikuläre Dysfunktion, QT-Zeit-Verlängerung, Hämorrhagie sowie Schilddrüsendysfunktion. Hämatotoxische UAW wie Grad 3/4 Leuko-, Neutro-, Lympho- und Thrombopenie sowie Anämie traten in Studien in verschiedener Häufigkeit abhängig vom Tumor auf [33,36].

Die geringe Ansprechrates und zunehmende angiogene Resistenz erfordern die Evaluierung prädiktiver Marker, die es ermöglichen, die Patienten mit klinischem Ansprechen frühzeitig zu identifizieren [46].

#### 1.4 Kolorektalkarzinom

Das Kolorektalkarzinom (CRC) ist die zweithäufigste Krebserkrankung und steht nach Lungenkrebs bei Männern und Brustkrebs bei Frauen an zweiter Stelle der krebsbedingten Todesursachen in Deutschland [47,48]. 2008 wurde bei 35 350 Männern und bei 30 040 Frauen ein CRC diagnostiziert, wobei in diesem Zeitraum jeweils 13 726 Patienten und 12 936 Patientinnen am CRC verstarben. Zwei Drittel der Erkrankungen sind im Dickdarm lokalisiert und etwa 30 % im Enddarm. Des Weiteren können der Übergang zwischen Dick- und Enddarm sowie der Analbereich betroffen sein [48]. Histologisch handelt es sich fast ausschließlich um Adenokarzinome, vom Epithelgewebe ausgehende Karzinome exo- und endokriner Drüsen [48,49]. Das Erkrankungsrisiko ist abhängig vom Alter und steigt mit diesem kontinuierlich an. Dabei erkranken nur 10 % der Patienten vor dem 55. Lebensjahr (Abb. 1.5). Weitere Risikofaktoren sind neben dem Alter der Verzehr ballaststoff- und gemüsearmer sowie fettreicher Nahrung mit einem hohen Anteil an rotem Fleisch. Zudem sind Bewegungsmangel, ein regelmäßiger Zigaretten- und Alkoholkonsum, genetische Prädisposition und bestehende chronische, entzündliche Darmerkrankungen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert [48].

2002 wurde ein von den Krankenkassen unterstütztes nationales Screening-Programm eingeführt, in dem Patienten zwischen 50 und 54 Jahren ein Test auf okkultes Blut im

Stuhl und ab dem 55. Lebensjahr alle zehn Jahre eine Koloskopie oder alternativ alle zwei Jahre ein Stuhltest auf okkultes Blut erstattet wird [48]. Das CRC wird oft erst relativ spät diagnostiziert, da in der Regel zu Beginn nur unspezifische Symptome auftreten [50]. Zwischen 10 und 25 % der Patienten haben daher zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasen entwickelt (Tab. 1.1) [51-53], die im Allgemeinen aufgrund des portalen Kreislaufs häufig in der Leber auftreten [53,54].

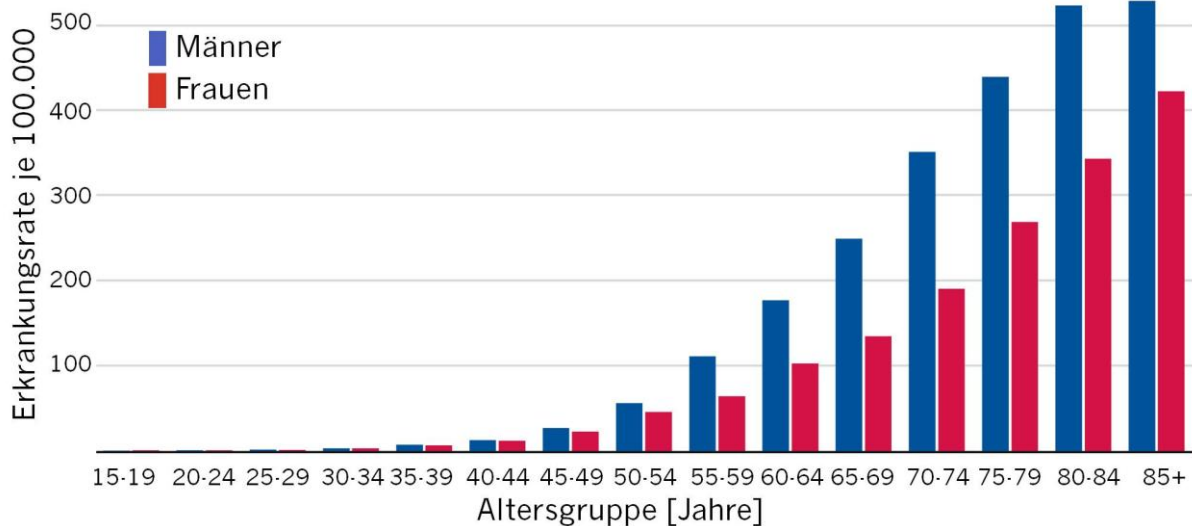


Abb. 1.5 Altersspezifische Erkrankungsraten an einem CRC (Klassifikation: ICD-10 C-18 - C-21) nach Geschlecht in Deutschland 2007 bis 2008 (nach [48]).

CRC: Kolorektalkarzinom; ICD: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme

Die Ausdehnung des Tumors wird mit Hilfe der TNM-Klassifikation beschrieben. Das System basiert auf der Beschreibung der Tumorgröße (T1-4), dem Befall von Lymphknoten (N0-3) und dem Nachweis von Metastasen (M0/M1). Ausgehend vom TNM-System wurde ein Klassifikationssystem entwickelt, das etwas gröber, aber an die klinischen und therapeutischen Möglichkeiten angepasst ist (UICC-Stadien, *Union Internationale Contre le Cancer*) [53] (Tab. 1.1). Frühe, aber insbesondere die späten Stadien des CRC sind mit einer erhöhten Angiogeneseaktivität verbunden [51]. Dafür scheinen unter anderem Mutationen oder der Verlust des adenomatösen Polyposis Coli Gens (APC, Tumorsuppressorgen) und des p53-Gens oder die Aktivierung von K-ras verantwortlich zu sein. Auch eine erhöhte Aktivität der Cyclooxygenase-2 ist mit einer gesteigerten Angiogenese assoziiert [51,54]. Zudem gibt es Hinweise, dass die Expression von VEGF und seinem Rezeptor 2 mit der Vaskularität, Metastasierung und der Proliferation des CRC korreliert [55]. Das Kolorektalkarzinom gehört zu den

Krebserkrankungen mit mittlerer Prognose, die sich mit dem Stadium verschlechtert und definiert als 5-Jahresüberlebensrate zwischen 93 und 8 % liegt [53] (Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Klassifikation, Inzidenz und Prognose bei Patienten mit Kolorektalkarzinom [53]

UICC-Stadium	TNM	Inzidenz <sup>#</sup>	5-Jahres-Überlebensrate
I	T1 oder T2, N0, M0	15 %	93 %
IIa	T3, N0, M0	30 %	85 %
IIb	T4, N0, M0	6 %	72 %
IIIa	T1 oder T2, N1, M0	2 %	83 %
IIIb	T3 oder T4, N1, M0	17 %	64 %
IIIc	T1-4, N2, M0	9 %	44 %
IV	T1-4, N0-2, M1	22 %	8 %

<sup>#</sup>Anzahl der Neuerkrankungen; UICC: Union Internationale Contre le Cancer; T: Tumor; N: Lymphknoten; M: Metastasen

In frühen Stadien kann eine Operation allein zur Heilung führen. In späteren Stadien jedoch stehen zur Behandlung des CRC neben einer Operation, adjuvante, neoadjuvante und palliative Chemotherapien zur Verfügung, die in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium ausgewählt werden. Zur adjuvanten und neoadjuvanten Therapie werden die Arzneistoffe Fluorouracil (5-FU) zusammen mit Folinat, Capecitabin und Oxaliplatin angewendet. Klassischerweise kommen in diesem Fall das FOLFOX- (Folinat, Fluorouracil, Oxaliplatin), Cap- (Capecitabin) und das CapeOx-Schema (Capecitabin, Oxaliplatin) zum Einsatz. Bei Metastasierung und zur palliativen Behandlung stehen Regime bestehend aus unterschiedlichen Kombinationen aus Fluorouracil und Folinat, Capecitabin, Oxaliplatin, Irinotecan sowie der monoklonalen Antikörper Bevacizumab, Cetuximab (bei K-ras Wildtyp) und Panitumumab (bei K-ras Wildtyp) zur Verfügung [53,56].

Die Überexpression proangiogener Faktoren und Rezeptoren rechtfertigt eine Therapie mit antiangiogenen Substanzen, zu denen Bevacizumab und auch Sunitinib gehören. Grundlage für das Dosierungsschema von Sunitinib in der C-II-005-Studie waren die vorzeitig publizierten Ergebnisse einer Phase I-Studie. Diese deuteten darauf hin, dass eine tägliche Dosis von 37,5 mg in Kombination mit Folinat, Fluorouracil und Irinotecan (FOLFIRI) über einen Zeitraum von vier Wochen und anschließender zweiwöchiger Pause sicher zu sein scheint [57].

## 1.5 Biomarker

### 1.5.1 Definition und Anwendung

Ein Biomarker ist definiert als Merkmal, das als Indikator für biologische und pathologische Prozesse oder das pharmakologische Ansprechen auf eine therapeutische Intervention gemessen und evaluiert wird. Ein Biomarker, der dazu geeignet ist einen klinischen Endpunkt zu ersetzen, wird dabei als Surrogatendpunkt bezeichnet. Dieser sollte einen klinischen Effekt basierend auf epidemiologischer, therapeutischer, pathophysiologischer oder wissenschaftlicher Evidenz vorhersagen können [58].

Mit der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapiemöglichkeiten besteht ein wachsender Bedarf an der Identifizierung und Validierung von Biomarkern, die dazu geeignet sind, schon während der Entwicklung erste Abschätzungen der Wirksamkeit und Toxizität zu ermöglichen, anhand derer frühe 'go'- oder 'no go'-Entscheidungen getroffen werden können [59]. Für frühe Phasen der klinischen Prüfung inklusive der Erstanwendung am Menschen (*First-in-Man-Studien*) können mit Hilfe geeigneter Biomarker die optimale therapeutische Dosierung sowie entsprechende Therapieregime definiert werden.

Die zielgerichteten Therapien, zu denen auch die Therapie mit Sunitinib gehört, sind im Allgemeinen weniger toxisch als die klassischen Chemotherapeutika. Die optimale therapeutische Dosis kann hier von der maximal tolerierbaren Dosis, die oft mit dem besten klinischen Ansprechen assoziiert ist, abweichen [60,61]. Neben dem erhöhten Risiko therapiebedingter Toxizität können beispielsweise hohe Dosierungen antiangiogener Substanzen eine zu starke Reduktion der Tumorgefäße zur Folge haben, die die Verteilung anderer Chemotherapeutika in die Tumorzellen beeinträchtigt [60]. Aus diesem Grund müssen neue Kriterien zur Dosisoptimierung definiert werden. Dazu können festgelegte Zusammenhänge zwischen Dosis, Arzneistoffkonzentration, Biomarkern und dem klinischen Ansprechen genutzt werden [62]. Auch die Bestimmung des Tumordurchmessers zur Beurteilung der Wirksamkeit nach den RECIST- (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) Kriterien scheint bei antiangiogenen Therapien, die zytostatisch wirken, ungeeignet zu sein [33]. Zur frühzeitigen Identifizierung von Patienten, die möglicherweise auf die Therapie ansprechen, und zur Beurteilung des klinischen Benefits sind daher neue Marker, die das objektive vaskuläre Ansprechen wiedergeben, wesentlich [60]. Eine Korrelation zwischen Biomarker und klinischen Endpunkten, wie die Zeit bis zur Tumorprogression (*time to progression*, TTP), das progressionsfreie Überleben

(*progression-free survival*, PFS) und das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS), ist daher wichtig, um den Biomarker als Surrogatendpunkt zu qualifizieren [61]. Des Weiteren können Biomarker dazu dienen, eine Resistenz frühzeitig zu identifizieren oder bestimmte unerwünschte Wirkungen vorherzusagen. Das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen kann zur Strukturoptimierung, aber auch zur Beurteilung möglicher sinnvoller Therapie-Kombinationen herangezogen werden [60,61,63]. Biomarker können somit in der Arzneistoffentwicklung sowohl die translationale Forschung als auch den Übergang zu Phase III-Studien erleichtern [61,64]. Im klinischen Alltag können sie anschließend im Rahmen der personalisierten Medizin zur Diagnosestellung (z. B. Blutzucker bei Diabetes mellitus), zur Bestimmung des Stadiums (z. B. Blutdruck bei Hypertonie), für prognostische Zwecke (z. B. Verminderung der Tumorgröße bei verschiedenen Krebsarten) und für die Auswahl der Therapie (z. B. Trastuzumab bei HER2-positivem Mammakarzinom) sowie zur Überwachung und Kontrolle der Pharmakotherapie (z. B. HIV-Nukleinsäuren bei antiretroviraler Therapie) herangezogen werden [58,61,65]. Ein großer Vorteil der Biomarker und Surrogatendpunkte ist, dass sie generell früher und mit robusteren Methoden als klinische Endpunkte bestimmt werden können [66].

Im Zusammenhang mit der Sunitinibtherapie wurden neben zirkulierenden Zellen (Endothel- und Endothelvorläuferzellen) und bildgebenden Verfahren zur Beurteilung der vaskulären Funktion zirkulierende angiogene Faktoren bei Krebspatienten untersucht, zu denen insbesondere VEGF-A und dessen lösliche Rezeptoren 2 und 3 gehören [19,67-75].

### 1.5.2 Biomarkervalidierung

Neben dem Idealfall, dass der volle Effekt einer therapeutischen Intervention durch einen Biomarker wiedergegeben wird, können Biomarker mit der Erkrankung und der Therapie in folgenden Beziehungen stehen:

- Unabhängig: Biomarker und Erkrankung werden beide durch die Therapie beeinflusst, allerdings wird der Effekt auf die Erkrankung nur teilweise durch den Biomarker beschrieben.
- Falsch positiv: Die Therapie hat einen positiven Effekt auf den Biomarker, aber keinen bzw. einen negativen Effekt auf die Erkrankung.
- Falsch negativ: Die Intervention beeinflusst die Erkrankung, aber nicht den Biomarker [64].

Daher ist es bedeutsam, bei der Auswahl des Biomarkers den zugrundeliegenden Mechanismus zu berücksichtigen. Man unterscheidet dabei biochemische von den

klinischen Biomarkern. Biochemische Biomarker dienen dabei als *Proof-of-Concept* des angenommenen Mechanismus, während klinische Biomarker mit dem Therapieansprechen korrelieren und als Surrogatendpunkte herangezogen werden können [66]. Neben der Auswahl umfasst der Prozess der Biomarkervalidierung auch die Methodvalidierung zur Quantifizierung des Biomarkers in einer geeigneten biologischen Matrix. Dabei sollte die Erforschung und Validierung der Biomarker bereits in der Arzneistoffentwicklungsphase beginnen, damit sie in der frühen Entwicklung die Auswahl geeigneter Arzneistoffkandidaten unterstützen können [66]. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung müssen die Biomarker allerdings noch nicht vollständig validiert sein, solange die Methoden zuverlässige Daten, Informationen und Erkenntnisse liefern. Hier soll lediglich die Aktivität der Erkrankung und der Einfluss der Medikation reflektiert werden. Idealerweise folgt darauf eine Pilotstudie, die die Qualifizierung und Quantifizierung sowohl möglicher Unterschiede zwischen Gesunden und Kranken als auch zwischen Individuen erlaubt. Letztendlich eignen sich nur wenige Biomarker als Surrogatendpunkt, für deren Evaluierung große klinische Studien in späteren Phasen nötig sind, die einzelne Korrelationsanalysen oder idealerweise Metanalysen mehrerer klinischer Studien ermöglichen [58,64,65].

## 1.6 Immunoassays zur Biomarkerbestimmung

### 1.6.1 Prinzip

Die Entwicklung der Immunoassays begann in den 60er und 70er Jahren. Das zugrunde liegende Messprinzip ist eine hochaffine Bindung eines Antikörpers an ein Antigen, die auf nicht-kovalenten Bindungen (Wasserstoff-Brücken-, elektrostatische Van-der-Waals- und hydrophobe Bindungen) beruht. Seit 1975, als nach Entwicklung der Hybridomatechnik die Möglichkeit bestand auch monoklonale Antikörper mit definierter Epitopenspezifität herzustellen, wurde die Methodik rasant weiter entwickelt [76]. Immunoassays gelten derzeit als Methode der Wahl zur Bestimmung von Proteinen in biologischen Matrices. Sie sind jedoch auch zur Quantifizierung von klein- bis hin zu großmolekularen Arzneistoffen geeignet und stellen damit eine kosteneffektive Alternative zur Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einer Tandem-Massenspektrometrie (*liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*, LC-MS/MS) in der Analytik klinischer Studienproben dar. Zudem benötigen sie nur geringe Probenvolumina [59].

Es stehen verschiedene Festphasensysteme zur Verfügung. Generell unterscheidet man direkte und indirekte enzymgebundene Immunadsorptionsassays (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) sowie kompetitive und nicht-kompetitive ELISA. Die meist verwendeten Systeme sind die nicht-kompetitiven Sandwich-ELISA [76]. Das Messprinzip eines Immunoassays beruht auf der Bindung eines Analyten (Antigen) an immobilisierte für dieses Antigen spezifische Antikörper. Ein an ein Enzym gebundener Zweitantikörper bindet den Analyten (direkt, nicht-kompetitiv) oder einen an das Antigen gebundenen Antikörper (indirekt). Alternativ kann eine definierte Menge enzymmarkierter Antigene mit dem Analyten um die Bindung an immobilisierte Antikörper konkurrieren (kompetitiv). Anschließend zugegebene Substrate werden von den Enzymen zu farbigen Produkten umgesetzt oder führen durch die katalysierte chemische Umsetzung des Substrats zu Lumineszenz, deren Intensität entsprechend mit einem UV-Spektrometer bzw. einem Luminometer gemessen werden kann. Anhand parallel vermessener Standardproben und einer entsprechenden Kalibrierkurve kann der Analyt quantifiziert werden (Abb. 1.6).

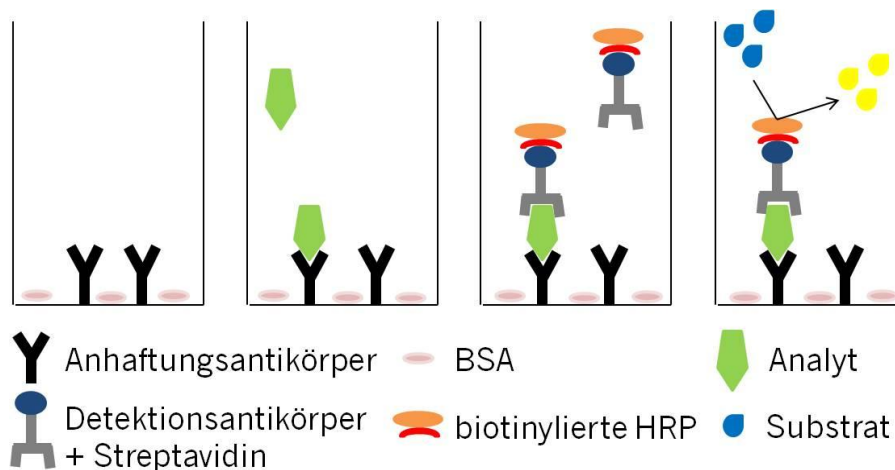


Abb. 1.6 Schematische Darstellung des Messprinzips eines Sandwich-ELISA.

BSA: Rinderserumalbumin; HRP: Meerrettich-Peroxidase

### 1.6.2 Validierung

Ein wichtiger und kritischer Punkt im Prozess der Biomarkervalidierung ist die Validierung entsprechender analytischer Methoden zur Quantifizierung des Biomarkers in einer geeigneten biologischen Matrix [65]. Die Entwicklung und Validierung von Immunoassays zur Quantifizierung von Biomarkern stellt oft eine Herausforderung dar, da neben häufig fehlenden Referenzstandards aufgrund des endogenen Vorkommens des Biomarkers nur selten eine analytfreie Matrix zur Verfügung steht [59,65]. Lange Zeit gab es keine geeigneten Leitlinien zur Validierung



von ligandenbindenden Assays, die die im Vergleich zu chromatografischen Methoden bestehenden Unterschiede berücksichtigen. Zu den relevanten Unterschieden gehören insbesondere der biologische Ursprung von Referenzstandard und Antikörpern und die damit verbundene geringere Präzision und Richtigkeit sowie die Nichtlinearität der Kalibrierkurven. Zudem wurde bei der Messung endogener Substanzen eine hohe interindividuelle Variabilität beobachtet. Viele Faktoren, zu denen neben dem pH-Wert, Kationen und Viskosität auch Plasmabestandteile, wie Lipide, hämatolytische Produkte, Serumproteine, Antikoagulantien, Proteasen, Bindungsproteine, Autoantikörper, heterophile anti-IgG-Antikörper sowie nach einer Therapie mit chimären monoklonalen Antikörpern entwickelte humane anti-Maus-Antikörper (HAMA), können die Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflussen. Die Faktoren unterscheiden sich zudem häufig zwischen Gesunden und Kranken, sodass die separate Untersuchung von gesunden und kranken Individuen ein wichtiger Bestandteil der ELISA-Validierung ist [59,76-80].

Als Erstes befasste sich die *Crystal City Conference* mit den Grundlagen der bioanalytischen Methodvalidierung, die lange Zeit als *de facto*-Leitlinie für die Pharmazeutische Industrie galten [59]. Da insbesondere Leitlinien der bioanalytischen Methodvalidierung von Makromolekülen fehlten, entwickelte später ein Subkommittee der *Ligand Binding Assay Bioanalytical Focus Group* (LBABFG) innerhalb der Amerikanischen Gesellschaft für pharmazeutische Wissenschaftler (*American Association of Pharmaceutical Scientists*, AAPS) einen Konsensusbericht [81]. Seit Mitte 2011 steht nun eine Leitlinie zur Validierung von bioanalytischen Methoden der EMA zur Verfügung, die in einem separaten Abschnitt Hinweise zur Validierung von ligandenbindenden Assays enthält [77].

## 1.7 Pharmakokinetische/Pharmakodynamische Modellierung

### 1.7.1 Grundlagen

Die Beschreibung der Pharmakokinetik (PK) und der Pharmakodynamik (PD) einer Substanz ist ein wichtiger Bestandteil der Arzneistoffentwicklung und wird bereits in Phase I-Studien an Probanden untersucht. Die PK-Daten können dabei in verschiedener Weise ausgewertet werden. Liegen viele Daten pro Individuum vor, so kann eine nichtkompartimentelle Auswertung (*non-compartmental analysis*, NCA) vorgenommen werden. Dabei werden keine strengen Annahmen zum Kurvenverlauf und zur Verteilung gemacht und die Arzneistoffexposition, beschrieben als Fläche

unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*, AUC), mit Hilfe von Trapezflächen berechnet. Die terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante  $\lambda_z$  ergibt sich dabei aus der Steigung des terminalen Abschnitts. Alle weiteren pharmakokinetischen Parameter, wie Clearance (CL), Verteilungsvolumen (V) und die terminale Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) lassen sich anschließend entsprechend berechnen.

Alternativ zur NCA-Methode können Kompartimentmodelle verwendet werden, die durch Verteilungsräume mit gleichen pharmakokinetischen Eigenschaften gekennzeichnet sind. Sie sind jedoch in der Regel nicht mit physiologischen Kompartimenten zu vergleichen. Mit Hilfe dieser Modelle kann das Konzentrations-Zeit-Profil mathematisch beschrieben werden. Dabei sind oft ein oder zwei Kompartimente ausreichend, um die PK der meisten Arzneistoffe hinreichend gut zu beschreiben [82].

Pharmakodynamische Modelle beschreiben dagegen den Effekt in Abhängigkeit von der Arzneistoffkonzentration am Wirkort und lassen sich häufig mit einem einfachen oder erweiterten  $E_{\max}$ -Modell beschreiben. Die Verknüpfung zwischen PK- und PD-Modellen ermöglicht die quantitative Beschreibung des Effekt-Zeit-Profiles eines Arzneistoffs. Im seltenen Fall eines zum Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma zeitgleich beobachteten Effekts können beide Modelle direkt miteinander verknüpft werden. Häufiger jedoch wird eine Zeitverzögerung des Effekts beobachtet, die durch eine indirekte Verknüpfung unter Zuhilfenahme eines Effektkompartiments, durch ein indirektes Response- oder ein zeitabhängiges Modell berücksichtigt wird. Zunehmend werden auch die zugrunde liegenden Wirkmechanismen, wie Rezeptorbindungsaffinitäten oder Transporter- und Enzymhemmungen, in den Modellen berücksichtigt, sodass aussagekräftigere mechanistische Modelle entstehen [82].

### 1.7.2 Populationspharmakokinetik und -dynamik

Neben der Auswertung der individuellen Profile sind auch die Abschätzung typischer pharmakokinetischer Parameter und deren interindividuelle Variabilität (IIV) in einer Population unter Berücksichtigung individueller Charakteristika wichtig, z. B. zur Beurteilung und Anpassung entsprechender Dosierungsregime bei Patienten mit Organdysfunktion. Die Auswertung pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Daten kann auf verschiedene Weisen erfolgen. In einer datenreichen Situation kann das Standard-Zwei-Stufen-Verfahren (*two-stage approach*) angewendet werden. Nach individueller Auswertung (Stufe 1) können die Verteilung und die Populationsmittelwerte bestimmt werden (Stufe 2). Da oft eine logarithmische

Normalverteilung zugrunde liegt, wird in der Regel der geometrische Mittelwert zur Berechnung herangezogen. Der Verteilung entsprechende Streumaße beschreiben die Variabilität, die der Summe aus interindividueller und unerklärbarer Restvariabilität entspricht. Individuelle Einflussfaktoren, die als Kovariaten bezeichnet werden, können anschließend mit einer linearen Regression oder einer Varianzanalyse untersucht werden [82,83].

Da mit Hilfe des Standard-Zwei-Stufen-Verfahrens weder die IIV abgeschätzt werden kann noch eine Auswertung in datenarmen Situationen möglich ist, die aus ethischen und finanziellen Gründen oft gegeben sind, wird immer mehr die nichtlineare Regression unter Berücksichtigung gemischter Effekte angewendet. Mit diesem Ansatz werden parallel typische Parameter der untersuchten Population und deren Verteilung abgeschätzt. IIV und Restvariabilität können dabei unterschieden werden [82]. Mittels der Bayeschen Abschätzungsmethode können zudem die individuellen Parameter bestimmt werden [84]. Die bekannteste Software zur nichtlinearen Modellierung mit gemischten Effekten ist NONMEM® [85].

### 1.7.3 Bedeutung

Die Entwicklung und Anwendung mathematischer und statistischer Methoden zur Charakterisierung, zum Verständnis und zur Vorhersage der PK, PD und des Zusammenhangs zwischen Biomarkern und klinischem Ansprechen werden zunehmend unter dem Begriff „Pharmakometrics“ zusammengefasst [86]. Pharmakometrics gewinnt in der Arzneistoffentwicklung und -individualisierung zunehmend an Bedeutung. Die Entwicklung von PK/PD-Modellen unter Einbeziehung mechanistischer Aspekte erlaubt damit nicht nur die Anpassung entsprechender Modelle zur Beschreibung der Konzentrations- und Effekt-Zeit-Profile, sondern auch die Simulation klinischer Szenarien zu noch nicht untersuchten Fragestellungen [66]. Biomarker dienen in diesen Modellen häufig als pharmakodynamische Komponente. Die Einbeziehung in frühe Phasen der Arzneistoffentwicklung unterstützt die schnelle Identifizierung geeigneter Wirkstoffkandidaten. Die PK/PD-Modellierung ist zudem ein wichtiges Hilfsmittel für den Übergang zwischen den verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung [87]. So kann basierend auf präklinischen Daten (*in vivo*) und mechanistischen Komponenten (*in vitro*) eine präzisere Abschätzung der ersten Dosis in *First-in-Man*-Studien durch die Beschreibung der Dosis-Konzentrations-Zeit- und Toxizitätsprofile simuliert werden. Daten aus Phase I-Studien dienen anschließend zur Festlegung von Dosierungsregimen für die Phase II. Die unter Einbeziehung neuen Wissens, beginnend in der Präklinik bis hin zu Phase III-Studien, weiterentwickelten

PK/PD-Modelle tragen zu einer möglichst kurzen und damit kostengünstigeren Entwicklungsphase bei [87] (Abb. 1.7).

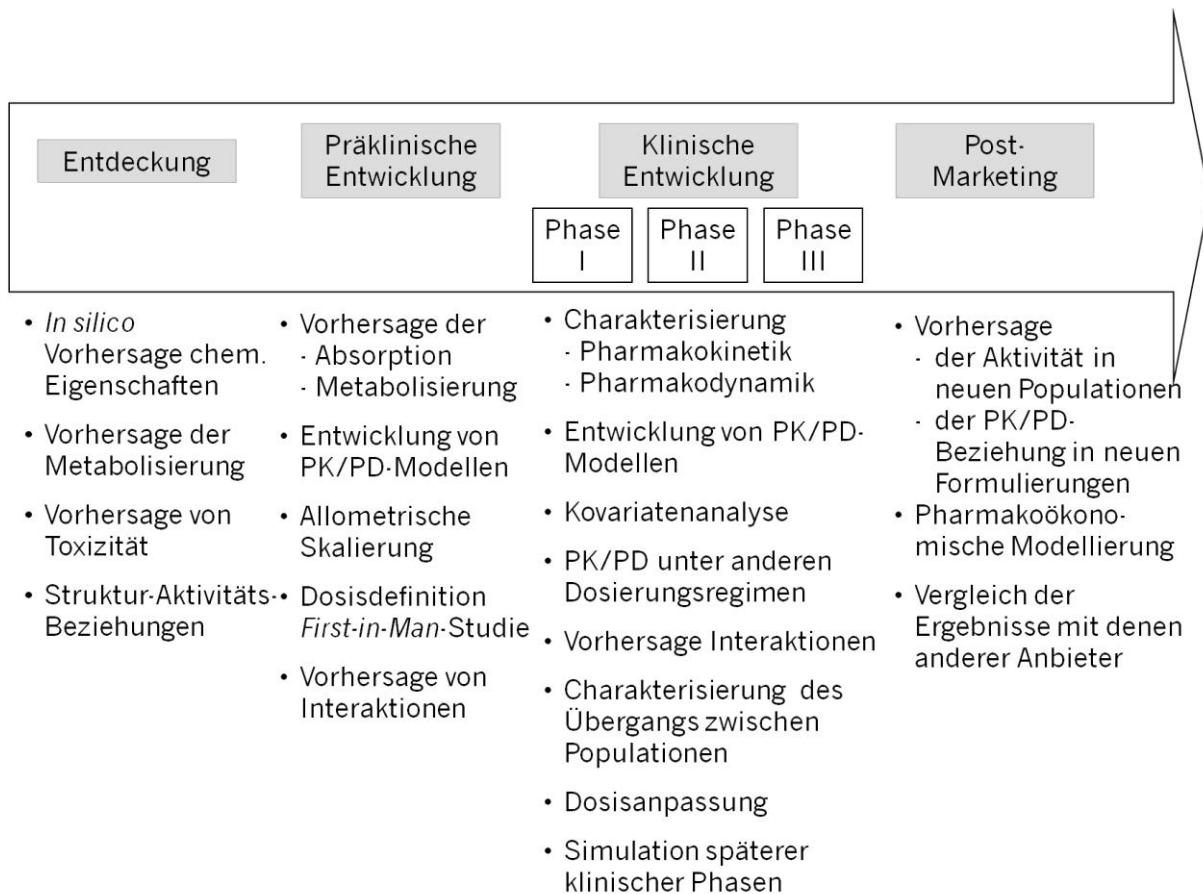


Abb. 1.7 Bedeutung der PK/PD-Modellierung in der Arzneimittelentwicklung (modifiziert nach [83]).

PK: Pharmakokinetik; PD: Pharmakodynamik

Des Weiteren können alternative Studiendesigns simuliert und Konsequenzen abgeschätzt werden. Dazu gehört auch die Identifizierung des optimalen Probenentnahmeschemas, das insbesondere in Situationen mit limitierter Anzahl an Patienten oder Proben pro Patient z. B. pädiatrische oder geriatrische Studien essentiell für die anschließende Auswertbarkeit der Daten ist [88]. Die Integration von Patientencharakteristika ermöglicht zudem nicht nur die Erklärung eines Teils der beobachteten Variabilität, sondern auch die Entwicklung einer individualisierten Dosierungsstrategie zur Optimierung des klinischen Ansprechens [87].

Auch die Zulassungsbehörden erkennen die PK/PD-Modellierung und Simulation als wichtiges Werkzeug während der Arzneistoffentwicklung und darüber hinaus an. Entsprechende Leitlinien der FDA und EMA regeln die Vorgehensweise und Dokumentation während der Arzneistoffentwicklung [88,89]. Häufig tragen Ergebnisse

aus PK/PD-Untersuchungen maßgeblich dazu bei, bestimmte Fragestellungen hinsichtlich der Dosierung sowie Dosis-Sicherheits- und Dosis-Wirksamkeits-Beziehungen innerhalb des Zulassungsprozesses zu beantworten [83].

## 1.8 Überlebenszeitanalysen

Das Überleben ist das wichtigste Gut im Dasein aller Lebewesen. Somit stehen Untersuchungen zur Überlebenszeit schon lange im Interesse der Forschung und Überlebenstafeln sind eine der ältesten bekannten statistischen Methoden. Auch in der klinischen Forschung sind das Gesamtüberleben (OS) oder auch das progressionsfreie Überleben (TTP), das oft aus zeitlichen und ökonomischen Gründen als Surrogat für das Gesamtüberleben verwendet wird, klinische Endpunkte, die im direkten Interesse des Patienten stehen. Sie werden herangezogen, um die Wirksamkeit einer Therapie zu bestimmen und zu quantifizieren.

Die Herausforderung in der Auswertung von Überlebensdaten besteht zum einen in der Kombination eines binären Ereignisses mit einer Zeitkomponente, sodass diese Daten nicht für eine logistische Regression zur Verfügung stehen, und zum anderen im Umgang mit rechts-zensierten Daten, die als Daten von Patienten, deren Ereignis am Ende der Beobachtungszeit noch nicht eingetreten ist, definiert sind [90,91]. Der entscheidende Durchbruch kam mit der von Edward Kaplan und Paul Meier 1958 unter gleichem Namen eingeführten nichtparametrischen Analyse, mit deren Hilfe Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der Zeit berechnet und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt werden [92]. Der quantitative Vergleich zweier Überlebensverteilungen gelang Nathan Mantel und William M. Haenszel im Jahr 1966 mit der Einführung des *Log-Rank-Tests* [91]. Mit der 1972 von David R. Cox beschriebenen Regressionsmethode, mit der basierend auf dem proportionalen Hazard-Modell der Einfluss von Kovariaten quantifiziert werden konnte [93], war das Feld für komplexe Auswertungen von *Time-to-Event-Daten* (TTE) und die Weiterentwicklung spezialisierter Auswertungsmethoden geöffnet [91].

Überlebensdaten sind in der Regel nicht normalverteilt. Klassische Verteilungen sind die Exponential-, die Weibull- und die Gompertz-Verteilung. Bei der Exponentialverteilung wird die Hazard-Funktion  $h(t)$  mit einer zeitunabhängigen, konstanten Hazard-Funktion  $\lambda$  beschrieben und stellt somit die einfachste Verteilung dar (Gl. 1.1).

$$h(t) = \lambda \quad \text{Gl. 1.1}$$

Die Weibullverteilung unterscheidet sich von der Exponentialverteilung durch einen weiteren formgebenden Parameter  $\gamma$ , der abhängig von seinem Zahlenwert eine monoton wachsende ( $\gamma > 1$ ) oder abfallende ( $\gamma < 1$ ) Hazard-Funktion  $h(t)$  beschreibt (Gl. 1.2). Durch die höhere Flexibilität ist die Weibullverteilung die am weitesten verbreitete Verteilung zur Beschreibung von Überlebensdaten [90,94].

$$h(t) = \lambda \cdot \gamma \cdot t^{\gamma-1} \quad \text{Gl. 1.2}$$

Die Gompertz-Verteilung weist ebenfalls einen Parameter,  $\theta$ , auf, der die Form der Hazard-Funktion beschreibt. Das Modell wurde 1825 zur Beschreibung der menschlichen Sterblichkeit eingeführt, findet nun jedoch insbesondere in der Demographie und den biologischen Wissenschaften Anwendung (Gl. 1.3) [90].

$$h(t) = \lambda \cdot e^{\theta \cdot t} \quad \text{Gl. 1.3}$$

Mit Hilfe der Überlebenszeitanalysen können verschiedene klinische Fragestellungen beantwortet werden. So werden sie regelmäßig zur Beurteilung der Wirksamkeit einer Substanz im Vergleich zu Placebo oder einer Standardtherapie herangezogen. Dabei können das mediane Überleben, aber auch die Chancen, dass unter einer bestimmten Therapie zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Ereignis auftritt, verglichen werden [95]. Neben der PK/PD-Modellierung gewinnt die Modellierung von Überlebensdaten immer mehr an Bedeutung. Die Verwendung nichtlinearer Modelle mit gemischten Effekten ermöglicht die Quantifizierung der interindividuellen Variabilität und der Restvariabilität sowie bestimmter Einflüsse von patientenspezifischen Kovariaten [83]. Mit steigender Rechenleistung und -geschwindigkeit der Computer werden *Time-to-Event*-Daten zunehmend in PK/PD-Modelle einbezogen. Derzeit wird intensiv an der Entwicklung und Etablierung neuer Abschätzungsmethoden zur Berechnung von *Time-to-Event*-Modellen in NONMEM® gearbeitet [96].

Die quantitative Verknüpfung prädiktiver Patientencharakteristika mit patientenrelevanten Endpunkten ermöglicht eine Unterscheidung zwischen Patienten, die auf die Therapie ansprechen oder nicht ansprechen, sodass frühzeitig in die Therapie eingegriffen und die Therapie gegebenenfalls angepasst werden kann [83].

## 2. Zielsetzung

Da nur wenige Patienten im fortgeschrittenen Stadium auf eine antiangiogene Therapie ansprechen, werden dringend prädiktive Marker benötigt, um diese Patienten frühzeitig zu identifizieren und entsprechende therapeutische Maßnahmen, wie Dosisanpassung oder auch einen Therapiewechsel ohne Zeitverlust vorzunehmen [46]. Ziel dieser Arbeit war die Analyse und Quantifizierung potentieller prädiktiver Parameter für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit metastasiertem Kolorektalkarzinom, die mit einer Kombinationstherapie aus Folinat, Fluorouracil, Irinotecan und Sunitinib behandelt wurden.

Im Rahmen einer prospektiven Phase II-Studie sollte die Pharmakokinetik von Sunitinib und dem aktiven Metaboliten SU12662 sowie die Pharmakodynamik, beschrieben durch die Konzentration von drei Proteinen (VEGF-A, sVEGFR-2, sVEGFR-3) als Biomarker, untersucht werden. Neben der Bestimmung der Plasmakonzentrationen von VEGF-A und sVEGFR-2, wurde zunächst ein Immunoassay zur Quantifizierung von sVEGFR-3 in menschlichem Plasma validiert sowie dessen Anwendbarkeit in zwei klinischen Studien an Probanden und Patienten gezeigt.

Die zuvor für Gesunde entwickelten PK/PD-Modelle [97] wurden anschließend angepasst, um den Konzentrations-Zeit-Verlauf von VEGF-A, sVEGFR-2 und sVEGFR-3 auch für mCRC-Patienten zu beschreiben. Die PK/PD-Modelle dienten zur Abschätzung individueller pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Parameter und für Simulationen individueller Konzentrations-Zeit-Profile, die mit Hilfe von Kaplan-Meier-Analysen, uni- oder multivariaten Cox-Regressionen oder NONMEM-basierten *Time-to-Event*-Modellen auf ihre Prädiktivität untersucht wurden.





### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Human VEGFR-3 (Flt-4) DuoSet ELISA R&D Systems, Minneapolis, USA

Enthält:

Anhaftungsantikörper

Detektionsantikörper

Standard VEGFR-3 (Flt-4)

Streptavidin-HRP

Katalog-Nummer: DY349

Waschpuffer-Konzentrat R&D Systems, Minneapolis, USA

Katalog-Nummer: WA126

Reagenzien-Verdünnungskonzentrat 2 R&D Systems, Minneapolis, USA

Katalog-Nummer: DY995

Substrat-Verdünnungen R&D Systems, Minneapolis, USA

Enthalten:

Reagenz A – Wasserstoffperoxid

Reagenz B – Tetramethylbenzidin

Katalog-Nummer: DY999

Abstopp-Lösung – 2N Schwefelsäure R&D Systems, Minneapolis, USA

Katalog-Nummer: DY994

CrossDown™ Puffer Applichem, Darmstadt

Fetales Kälberserum (FKS) Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Rinderserumalbumin (BSA) Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Human VEGF-A QuantiGlo™ ELISA Kit R&D Systems, Minneapolis, USA

Katalog-Nummer: DVE00B

Human sVEGFR-2 Quantikine™ ELISA Kit R&D Systems, Minneapolis, USA

Katalog-Nummer: DVR200

PURELAB® Plus Wasser ELGA Berkefeld GmbH, Celle

Natriumchlorid (NaCl)	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm

### 3.1.2 Lösungen und Puffer

#### Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer)

137 mM NaCl	8,0 g
2,7 mM KCl	0,2 g
8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,204 g
PURELAB® Plus Wasser	ad 1000,0 mL
pH 7,2 - 7,4; 0,2 µm steril filtriert	

#### Reagenzien-Verdünnung (1:10)

Reagenzien-Verdünnungskonzentrat 2	1 Teil
PURELAB® Plus Wasser	9 Teile

#### Anhaftungsantikörper (1:180)

Anhaftungsantikörper-Konzentrat	1 Teil
PBS	179 Teile

#### Detektionsantikörper (1:225)

Detektionsantikörper-Konzentrat	1 Teil
Reagenzien-Verdünnung (1:10)	224 Teile

#### Streptavidin-HRP-Verdünnung (1:200)

Streptavidin-HRP-Konzentrat	1 Teil
Reagenzien-Verdünnung (1:10)	199 Teile

#### Substrat-Reagenz (1:1)

Reagenz A	1 Teil
Reagenz B	1 Teil

#### Waschpuffer (1:20)

Waschpuffer-Konzentrat	25 mL
PURELAB® Plus Wasser	ad 500 mL

## 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Multifly <sup>®</sup> 21G x 3/4“TW; 0,8 x 19 mm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Sarstedt K-EDTA Monovetten <sup>®</sup>	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Polypropylen-Probengefäße (0,5, 1,5, 2,0 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> Gefäße (15, 50 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Pipetten-Spitzen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Klare Polystyrol MicroPlates <sup>™</sup> (DY990)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Parafilm <sup>®</sup>	Brand GmbH & Co KG, Wertheim

## 3.1.4 Geräte

Universal 32 R Zentrifuge (1)	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Labofuge 400R Zentrifuge (2)	HERAEUS Instruments GmbH, Osterode
Einkanal-Pipetten (10 - 100 µL, 100 - 1000 µL)	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Zwölf-Kanal-Pipette (Transferpette <sup>®</sup> 12) (10 - 100 µL, 30 - 300 µL)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Glaspipetten (25, 50, 100 mL)	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Membranvakuumpumpe	Vacuumbrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortex-Mixer ZX3	Velp Scientifica srl, Usmate (MP), Italien
Edmund Bühler <sup>™</sup> TH 15I Inkubator	Edmund Bühler GmbH Lab Tec, Hechingen
Unimax <sup>™</sup> 1010 Schüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Multiscan <sup>®</sup> EX Multiwellreader Quartz-Wolfram Halogen Lampe Filter (450 nm, 570 nm)	Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finnland
FLUOstar <sup>®</sup> Optima Multiwellreader	BMG Labtech GmbH, Ortenberg

### 3.1.5 Software

Die deskriptive Statistik wurde mit Microsoft Excel™ (Version 2007, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), GraphPad Prism® (Version 4.00, GraphPad Software Inc., CA, USA) und R® (The R Foundation for Statistical Computing, Version, 2.10.1, 2009 und 2.14.1, 2011) durchgeführt. Die Software GraphPad Prism® diente zur Erstellung von Standardkurven für die Biomarkeranalytik und von Grafiken. Für die pharmakokinetische/pharmakodynamische Datenauswertung wurde die Software NONMEM® (Icon Development Solutions, Version 7.1.2) verwendet und für die anschließende grafische Auswertung Xpose (Niclas Jonsson, Mats Karlsson, Version 4.2.1, 2010) zusammen mit R®. PsN (Pearl speaks NONMEM Version 3.2.4) wurde für das Bootstrap-Verfahren und die Visual Predictive Checks (VPC) genutzt [98].

## 3.2 Entwicklung und Validierung einer ELISA-Methode zur Quantifizierung von sVEGFR-3

Der Prozess der Validierung ist generell in drei Phasen eingeteilt. Dazu gehört die Methodenentwicklung, die eigentliche Validierung (*Pre-Study-Validierung*) und die Implementierung der Methode in klinische Studien (*In-Study-Validierung*) [59,99].

Während der Methodenentwicklung wurden erste Untersuchungen zu Probenaufbereitung, Spezifität und Selektivität, Probenmatrix, Standardkurve, Stabilität und Robustheit mit dem Ziel der Optimierung durchgeführt. Erste Untersuchungen der Methodengüte und die Beurteilung der Akzeptanz des Analysenlaufes wurden in dieser Phase mit Hilfe von Standardproben untersucht [81]. Ziel der *Pre-Study-Validierung* war es, zu zeigen, dass die Methode zuverlässige analytische Ergebnisse liefert, die den zuvor festgelegten Akzeptanzkriterien entsprechen. Dabei wurden Standardkurve, Präzision und Richtigkeit, Quantifizierungsbereich, Selektivität, Stabilität, Verdünnungslinearität und Robustheit detaillierter untersucht. Ein Analysenlauf wurde in die Auswertung aufgenommen, wenn Standard-, Qualitätskontroll- und Validierungsproben innerhalb der Akzeptanzkriterien lagen [59,81].

Während der *In-Study-Validierung*, der Implementierung der Methode in den Routinegebrauch, wurde anschließend die Anwendbarkeit der Methode zur Messung klinischer Proben von gesunden und kranken Individuen unter fortlaufender Beobachtung der validierungsspezifischen Gütekriterien ermittelt. Zudem wurde die Stabilität des Analyten in der Studienmatrix weiter untersucht. Für die Akzeptanz des

Analysenlaufes mussten in dieser Phase die Qualitätskontrollproben (QC-Proben) und die Standardproben innerhalb der definierten Kriterien liegen [59,62,81,100].

### 3.2.1 Bestimmungsmethode

Zur Quantifizierung des löslichen VEGF-Rezeptors 3 wurde ein Sandwich-ELISA verwendet, der bereits zur Bestimmung von sVEGFR-3 in Zellüberstand validiert ist und kommerziell zur Verfügung steht (DuoSet™ for human VEGFR-3, R&D Systems, Minneapolis, USA). Es wurden Modifizierungen gemäß aktuell geltender Leitlinien für die bioanalytische Methodvalidierung der amerikanischen (FDA) und europäischen Arzneimittelbehörden (EMA) [77,79] sowie weiterer Empfehlungen für ligandenbindende Testsysteme vorgenommen, um die Anwendbarkeit auf humanes Plasma zu erweitern [59,80,81,101-104].

### 3.2.2 Probensammlung und -vorbereitung

Als Probenmatrix zur Bestimmung von sVEGFR-3 wurde humanes Plasma verwendet. Dazu wurden von freiwilligen Probanden Blutproben durch Venenpunktion in Sarstedt Monovetten® (7,5 mL), die Kalium-Ethylendiamintetraacetat (K-EDTA) als Chelator zur Antikoagulation enthielten, abgenommen und innerhalb von 30 min für 15 min zentrifugiert (4 °C, 1030 g). Das abgetrennte Plasma wurde zu je 1 mL in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und im Allgemeinen bei –80 °C oder für weitere Untersuchungen zur Stabilität bei –20 °C gelagert.

### 3.2.3 Spezifität, Selektivität und Verdünnungslinearität

Die Authentizität des Analyten wurde vom Hersteller (R&D Systems) mittels Coomassie-Blau Western Blot bestimmt und sicher gestellt (telefonische Information). Die Spezifität wurde ebenfalls zuvor vom Hersteller untersucht. Dabei wurden keine Kreuzreaktionen oder Interferenzen durch 100 ng/mL VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-D und den beiden chimären VEGF-Rezeptoren/Fc 1 und 2 festgestellt. Der rekombinante VEGF-C zeigte keine Kreuzreaktionen, störte jedoch den Assay bei Konzentrationen über 6,25 ng/mL. Kreuzreaktionen konnten dagegen bei hohen Konzentrationen von rekombinantem, chimären Maus-VEGFR-3 (> 3,12 ng/mL) beobachtet werden [105].

Die Selektivität, definiert als Fähigkeit den betrachteten Analyten in Anwesenheit anderer Substanzen zu messen, wurde mit Hilfe der Wiederfindung bestimmt, für die gleiche Akzeptanzkriterien, wie für die Richtigkeit, galten (siehe 3.2.6). Da keine analytfreie Matrix zur Verfügung stand, wurde die Wiederfindung aus dem Quotienten der Differenz aus gespikter und reiner Plasmaprobe und der entsprechenden

Konzentration, die der gespikten Probe hinzugefügt worden ist, berechnet [59]. Mindestens 80 % der Proben mussten dabei innerhalb der Akzeptanzkriterien liegen, d.h. die Abweichung zum Referenzwert durfte nicht größer als 20 % sein [77,81,103]. Dazu wurden drei Experimente durchgeführt.

Zuerst wurde das Plasma von fünf Probanden in geeigneter Verdünnung mit verschiedenen Analytkonzentrationen versetzt. Um mögliche Interaktionen zwischen rekombinatem Analyten und Bestandteilen des humanen Plasmas auszuschließen, wurde zudem das Plasma von jeweils zwei der vier Probanden im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend vermessen. Es wurden 15 Plasmamischungen an sechs Validierungstagen untersucht, wobei der Mittelwert des reinen Plasmas beider Proben als Referenz für die entsprechende Mischung galt. Außerdem wurden Verdünnungsreihen zur Untersuchung niedriger Konzentrationen erstellt. Zwei Verdünnungsreihen wurden in sechs unabhängigen analytischen Läufen untersucht. Eine Verdünnungsreihe basierte dabei auf reinem Plasma, die andere auf Plasma, das zuvor mit rekombinatem Analyten versetzt worden war. Beginnend bei einer 1:6-Verdünnung wurde das Plasma in CrossDown™-Puffer weiter zu den Plasma/Puffer-Verhältnissen 1:8, 1:10, 1:12, 1:14 und 1:16 verdünnt. Die Wiederfindung wurde für jede Verdünnungsstufe separat berechnet.

Des Weiteren wurde die Verdünnungslinearität mit Hilfe der beiden oben genannten Verdünnungsreihen überprüft, um das Ausbleiben von Matrixeffekten sicher zu stellen, wenn die Plasmaproben in den Kalibrierbereich verdünnt werden. Die Präzision und Richtigkeit der rückgerechneten Konzentrationen jeder Verdünnungsstufe sollten dabei 20 % nicht überschreiten [77].

#### 3.2.4 Auswahl der Matrix und Parallelität

Für die Herstellung der Kalibratoren wird eine Surrogatmatrix benötigt, da der zu bestimmende Analyt sVEGFR-3 endogen im Plasma enthalten ist [77]. Während der Methodenentwicklung wurden fetales Kälberserum (FKS) und ein proteinhaltiger Puffer (1 %-ige BSA-Lösung) als mögliche Surrogatmatrizes verwendet [62,80]. Verschiedene Konzentrationen an sVEGFR-3 wurden der entsprechenden Matrix zugegeben, um eine Kalibrierkurve zu erstellen. Zum Vergleich wurden auch Plasmaproben mit den verschiedenen Analytkonzentrationen versetzt, um Konzentrationen über den gesamten Kalibrierbereich zu generieren [59,77,103,104]. Da das endogene Vorkommen von sVEGFR-3 zu Konzentrationen oberhalb des Kalibrierbereichs führte, wurde das Plasma vor der exogenen Zugabe des Analyten 1:10 mit CrossDown™-Puffer verdünnt. Die Konzentrationen der gespikten Plasmaproben wurden

anschließend mit Hilfe der in der getesteten Matrix hergestellten Kalibrierkurve bestimmt. Die Summe der zugegebenen und der endogenen Analytkonzentration der verdünnten Plasmaproben diente dabei als Referenzkonzentration. Die Matrix galt als geeignet, wenn die Kriterien für die Präzision und Richtigkeit (Variationskoeffizient und absoluter Wert des relativen Fehlers  $\leq 20\%$ ) erfüllt waren (siehe 3.2.6), wobei dieses Kriterium für mindestens zwei Drittel der gespikten Plasmaproben und mindestens 50 % der Ergebnisse einer Konzentrationsstufe in sechs unabhängigen Validierungsläufen erfüllt sein musste [59,77,78,81,103,104].

Während der *Pre-Study*-Validierung wurde die ausgewählte Matrix zur Herstellung der Standard- und QC-Proben verwendet.

Um die Eignung der Surrogatmatrix und potentielle Matrixeffekte zu bewerten, wurde die Parallelität der Konzentrations-Absorptionsprofile des Analyten in Surrogat- und zwei ausgewählten Verdünnungen der Studienmatrix (1:10 und 1:14) untersucht [59]. Die Konzentrations-Absorptionsprofile des Analyten in beiden Plasmaverdünnungsreihen (1:10 und 1:14) wurden visuell mit dem in der Surrogatmatrix verglichen. Parallelität war gegeben, wenn der Variationskoeffizient zwischen den Proben einer Verdünnungsreihe nicht mehr als 30 % betrug [77,81,103] und die Präzision und Richtigkeit jeder Probe innerhalb der Akzeptanzkriterien lagen (siehe 3.2.6) [104]. Um interindividuelle Unterschiede in der Zusammensetzung des Plasmas zu berücksichtigen, wurden insgesamt fünf verschiedene Probanden untersucht.

### 3.2.5 Kalibrierung

Während der Methodenentwicklung wurde die generell verwendete 4-Parameter-logistische (4-PL) Funktion und im Falle beobachteter Asymmetrie die 5-PL-Funktion getestet (Gl. 3.1) [59,81,104,106].

$$A(Y) = A_0 + \frac{A_{\max} - A_0}{\left(1 + \left(\frac{C}{IC_{50}}\right)^\gamma\right)^\delta} \quad \text{Gl. 3.1}$$

Dabei ist  $A(Y)$  die erwartete Absorption,  $A_{\max}$  die Absorption bei unendlich hoher Konzentration und  $A_0$  die bei einer Konzentration von 0,  $C$  die Konzentration,  $IC_{50}$  die Konzentration bei halbmaximaler Absorption,  $\gamma$  die Steilheit der Kurve und  $\delta$  ein Asymmetrie-Faktor, der die 5-PL- von der 4-PL-Funktion unterscheidet [106]. Zur Untersuchung auf Varianzhomogenität, die bei ligandenbindenden Analysemethoden oft nicht gegeben ist, wurden die Standardabweichungen der Absorptionen gegen den

jeweiligen Mittelwert der Absorptionen aufgetragen. Bei beobachteter Varianzenheterogenität, d.h. wenn die Variabilität mit steigender Absorption zunimmt, wurde die Absorptionen entsprechend gewichtet, um Absorptionen mit höherer Variabilität weniger Gewicht zu geben [59,80,81,106]. Sieben Kalibratoren mit Konzentrationen über den gesamten Kalibrierbereich wurden in der Surrogatmatrix hergestellt und in Doppelbestimmung vermessen [77,79]. Das Modell wurde akzeptiert, wenn mindestens 75 % der Standardlösungen einen absoluten Wert des relativen Fehlers (*relative error*, RE)  $\leq 20\%$  (25 % an der unteren Quantifizierungsgrenze (*lower limit of quantification*, LLOQ)) aufwiesen. Bei der Betrachtung aller Validierungsläufe sollten der Betrag des mittleren Fehlers und der Variationskoeffizient (*coefficient of variation*, CV) 15 % (20 % am LLOQ) nicht überschreiten [77,81,104]. Das Kalibriermodell wurde in mindestens sechs unabhängigen analytischen Läufen während der *Pre-Study*-Validierung bestätigt [81].

### 3.2.6 Präzision und Richtigkeit

Präzision und Richtigkeit wurden während der frühen Methodenentwicklung durch die Berechnung des Variationskoeffizienten und des mittleren relativen Fehlers der Standardproben abgeschätzt. Validierungsproben dienten zur Absicherung der ersten Abschätzungen. Dazu wurden ausgewählte Konzentrationen (entsprechend der ersten, dritten und vierten Standardprobe) in Studienmatrix in Sechsfachbestimmung in sechs unabhängigen Analysenläufen innerhalb der *Pre-Study*-Validierung vermessen [79,104]. Die Präzision und Richtigkeit innerhalb eines Tages (*within-day*) wurde separat für jeden der sechs Tage berechnet. Die endogene Konzentration des Analyten im Plasma war unbekannt. Aus diesem Grund wurde zur Berechnung des nominalen Wertes jeder Verdünnungsstufe die gemessene Analytkonzentration der Probe aus reinem Plasma zu der Analytkonzentration addiert, die der dazugehörigen gespikten Probe gleicher Verdünnung zuvor zugesetzt worden war. Die Präzision und Richtigkeit zwischen den Tagen (*between-day*) wurden für jede Konzentrationsstufe der Validierungsproben aller sechs Läufe berechnet [104]. Aufgrund der endogenen Präsenz des Analyten waren die Akzeptanzkriterien weniger streng als bei chromatographischen Methoden und entsprachen den generellen Empfehlungen für Immunoassays zur Quantifizierung von Biomarkern. Demnach sollten der Variationskoeffizient und der absolute Wert des relativen Fehlers 20 % (25 % am LLOQ) nicht überschreiten. Des Weiteren sollte der Gesamtfehler, definiert als Summe aus dem absoluten Wert des RE und dem CV, unterhalb von 30 % bleiben [59,77,78,81,103].



### 3.2.7 Stabilität

Die Stabilität, zu der die Langzeit- und die Einfrier-Auftaustabilität gehörten, wurde hauptsächlich während der *Pre-Study*-Validierung untersucht. Die Bestimmung der Langzeitstabilität wurde bereits während der Methodenentwicklung begonnen, um ausreichend lange Zeitperioden untersuchen zu können. Um eine Vergleichbarkeit zu den Studienproben zu gewährleisten, wurden reine Plasmaproben verwendet. Proben von einem bzw. zwei Probanden, die jeweils bei  $-20$  und  $-80$  °C gelagert und damit den Lagerbedingungen der Studienproben entsprachen, wurden über einen Zeitraum von einem Monat vermessen. Für einen der zwei Probanden wurde die Langzeitstabilität für weitere 14 Monate untersucht, um Stabilitätsdaten über einen Zeitraum zu generieren, der die Lagerdauer der Studienproben übertrifft [77]. Die Konzentration an sVEGFR-3 der ersten vermessenen Probe diente dabei als Referenzwert zur Berechnung des relativen Fehlers.

Zur Beurteilung der Einfrier-Auftaustabilität wurden drei Einfrier-Auftauzyklen mit mindestens 12 h zwischen den Auftauzyklen untersucht [77]. Alle Proben dieser Untersuchung wurden in einem Analysenlauf vermessen, um eventuelle tagesabhängige Schwankungen zu vermeiden. Als Referenz galten hier die sVEGFR-3-Konzentrationen in der Probe, die zuvor noch nicht aufgetaut worden war. Hinreichende Stabilität war gegeben, wenn der relative Fehler innerhalb der Akzeptanzkriterien der Richtigkeit lag (siehe 3.2.6) [77,81].

### 3.2.8 Robustheit

Die Robustheit wurde im Verlauf der frühen Methodenentwicklung untersucht. Als potentielle kritische Einflussfaktoren galten die Temperatur und das Schütteln während der Inkubation sowie die verwendete Surrogatmatrix [59,81,104]. Zuerst wurde die Inkubationstemperatur während des Bindungsprozesses zwischen Analyt und Antikörper variiert:  $4$  °C, Raumtemperatur,  $30$  und  $37$  °C. Anschließend wurde der Einfluss des Schüttelns während der Inkubationsschritte mit Analyt, Detektionsantikörper und Enzym untersucht. Da die Bindungsaffinität zwischen Analyt und Antikörper vom Medium abhängen kann [102], wurden als nächstes Surrogatmatrizes mit verschiedener Zusammensetzung getestet. Dazu wurden Kalibrierkurven in vier verschiedenen Matrizes aufgenommen (1 % BSA-Lösung, unbehandeltes oder inaktiviertes FKS sowie FKS von verschiedenen Herstellern) und die sVEGFR-3-Konzentration von fünf Probanden entsprechend berechnet und verglichen. Für zwei Matrizes wurden für ein Individuum der Probandenstudie (siehe

3.2.9) die Plasmakonzentrationen für den gesamten beobachteten Zeitraum ( $n = 37$ ) anhand zweier Standardkurven berechnet. Zur Beurteilung der Matrix wurden absolute und relative Werte der gemessenen Konzentrationen in den verschiedenen Matrizes miteinander verglichen und auf systematische Unterschiede hin untersucht.

Die Robustheit des Assays wurde basierend auf den Akzeptanzkriterien der Standard-, QC- und Validierungsproben beurteilt. Als weiteres Kriterium zur Beurteilung der Surrogatmatrix wurde die gewichtete Summe der Abweichungsquadrate (*weighted sum of squares*, WSS) als Gütekriterium der Standardkurve herangezogen.

Während der *Pre-Study*-Validierung wurden die Analysenläufe unter den Bedingungen durchgeführt, die sich bei der Methodenentwicklung als am geeignetsten herausstellten.

### 3.2.9 Anwendbarkeit in klinischen Studien

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Assays im Rahmen klinischer Studien, der *In-Study*-Validierung, wurde sVEGFR-3 in Plasmaproben aus zwei klinischen Studien bestimmt, in die gesunde Probanden und Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom (siehe 3.3) eingeschlossen waren.

#### *Qualitätssicherung während der Messungen*

Die Qualität während der Messungen wurde mit Hilfe der drei QC-Proben in Doppelbestimmung sichergestellt. Präzision und Richtigkeit mussten bei mindestens zwei Drittel der QC-Proben und mindestens 50 % jeder Konzentrationsstufe innerhalb von  $\pm 20$  % liegen [59,77,80,81,104]. Studienproben, Standardlösungen und QC-Proben wurden entsprechend der Bedingungen innerhalb Validierung hergestellt [77].

#### *Klinische Studie mit Probanden*

Zwölf Probanden wurden in eine explorative Studie (EudraCT-No: 2008-001887-36) eingeschlossen, die an drei (Pilotphase,  $n = 4$ ) oder fünf (Hauptphase,  $n = 8$ ) aufeinander folgenden Tagen 50 mg Sunitinib bekamen. Blutproben wurden 24, 20, 16, 8, und 4 Stunden vor der ersten Sunitinibapplikation abgenommen. Weitere Proben folgten direkt vor der ersten Dosis und 1, 2, 4, 8, 10, 12, 24, 25, 36, 48, 49, 60, 72, 96, 120, 240, 288, 336 und 384 Stunden danach. In der Hauptphase der Studie standen zusätzliche Proben nach 0,5, 24,5, 48,5, 72,5, 73, 96,5, 97, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 144, 168 und 432 Stunden zur Verfügung. Das Vollblut wurde direkt bei 4 °C 15 min lang zentrifugiert (780 g in der Pilotphase und 1030 g in der Hauptphase) und bei -80 °C gelagert. Eine detaillierte Beschreibung der Studie und der Ergebnisse wurde zuvor von Lindauer et al. publiziert [97].

Die sVEGFR-3-Plasmakonzentration direkt vor der ersten Dosis wurde als Basiswert definiert und der Konzentrations-Zeit-Verlauf für diese Population beschrieben. Das Ausmaß der Biomarkerantwort auf die Exposition mit Sunitinib wurde als maximale Veränderung bezogen auf den Basiswert quantifiziert.

### 3.3 Klinische Studie in Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom

#### 3.3.1 Zielsetzung

Die klinische Studie mit dem vollständigen Titel '*A prospective angiogenic imaging study with DCE-MRI and DCE-USI in patients with colorectal cancer and liver metastases receiving sunitinib in addition to 5-FU, folic acid and irinotecan (FOLFIRI) as 1st line therapy*' (EudraCT-No:2008-00151537, kurz C-II-005-Studie) wurde in Kooperation mit PD Dr. Klaus Mross als Leitenden Prüfarzt und von der Central European Society for Anticancer Drug Research – EWIV (CESAR) als Sponsor durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob die zusätzliche Gabe von Sunitinib zu einer Therapie mit Folinat, Fluorouracil und Irinotecan zu einer signifikanten Reduktion der Tumorgefäßpermeabilität und des Blutflusses in den Lebermetastasen führt. Ein weiteres Ziel der Studie, auf das im weiteren Verlauf näher eingegangen wird, war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Pharmakokinetik und den Biomarkern sVEGFR-2 und sVEGFR-3. Zudem wurden Daten zur Beschreibung der Zeit bis zur Progression erhoben [50] (Abb. 3.1).

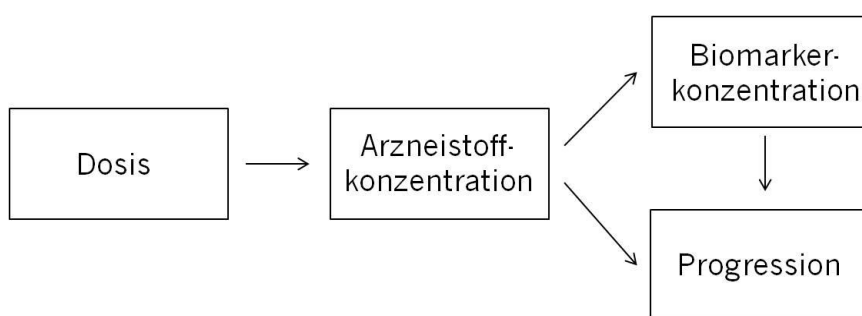


Abb. 3.1 Potentieller Zusammenhang zwischen Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Progression

Im Vordergrund stand dabei das Verständnis des Zusammenhangs zwischen der Dosierung von Sunitinib, den Plasmakonzentrationen von Sunitinib und dessen aktiven Metaboliten SU12662 (Pharmakokinetik), der darauf folgenden Veränderung der

beiden Biomarker sVEGFR-2 und sVEGFR-3 (Pharmakodynamik) sowie der Zeit bis zur Progression als patientenrelevantem Endpunkt.

### 3.3.2 Studiendesign

Die Studie war einarmig, offen und prospektiv angelegt. Vier verschiedene deutsche Zentren waren an der Durchführung der Studie beteiligt. Dazu gehörte das Zentrum für Tumorbiologie mit der Abteilung Medizinische Onkologie aus Freiburg (Zentrum 1), die Abteilung Gastroenterologie der Medizinischen Klinik der Albert-Ludwigs-Universität, Innere Universitätsklinik und Poliklinik Tumorforschung in Essen (Zentrum 2), die Abteilung Hämatologie und Onkologie des Marienhospitals in Herne (Zentrum 3) sowie die Abteilung Gastroenterologie der Universitätsklinik Freiburg (Zentrum 4). Die einzelnen Zentren standen jeweils unter der Leitung von PD Dr. Klaus Mross, Prof. Dr. Max Scheulen, PD Dr. Dirk Strumberg und PD Dr. Richard Fischer [50].

### 3.3.3 Patienten

Es wurden insgesamt 28 Kolorektalkarzinom-Patienten mit einem ECOG-Status (Eastern Cooperative Oncology Group) von 0 oder 1 in die Studie aufgenommen. Alle Patienten waren über 18 Jahre alt und wiesen bereits Lebermetastasen mit mindestens einer Läsion  $> 2$  cm auf, die mittels Magnetresonanztomographie (MRT) nach den RECIST-Kriterien auswertbar war. Ein Patient wurde ausgeschlossen, wenn dieser unter anderem weniger als sechs Monate zuvor eine adjuvante Therapie bestehend aus Folinat, Fluorouracil und Oxaliplatin (FOLFOX) oder Fluorouracil allein oder eine andere palliative Therapie erhalten hatte. Ein weiteres Ausschlusskriterium war eine vorangegangene Therapie mit Sunitinib, einem anderen Tyrosinkinase-Inhibitor oder Bevacizumab [50]. Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten, mussten vor Eintritt in die Studie eine Einwilligungserklärung unterschreiben. Die Studie wurde im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und entsprechenden europäischen und internationalen Leitlinien durchgeführt.

Sieben der 28 Patienten gingen wegen fehlender Studienmedikation ( $n = 5$ ), fehlender Daten ( $n = 1$ ) oder mangelnder Dokumentation ( $n = 1$ ) nicht mit in die Analyse ein. Von den 21 auswertbaren Patienten stammten jeweils fünf und sieben aus den beiden Freiburger Zentren 1 und 4, sechs aus Essen und drei aus Herne. Die demographischen Daten der Patienten sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1 Mediane demographische Daten der Patienten der C-II-005-Studie (Spanne)

Alter [Jahre]	Geschlecht	Gewicht [kg]	Größe [cm]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
61 (33 - 85)	12/9 (m/f)	73 (57 - 106)	172 (149 - 184)	26,0 (19,3 - 39,3)

m: männlich; f: weiblich; BMI: Body-Mass-Index

### 3.3.4 Medikation

Sämtliche Patienten wurden mit einer Kombination aus Folinat, Fluorouracil, Irinotecan und Sunitinib in sechswöchigen Zyklen palliativ als Erstlinientherapie behandelt. Sunitinib wurde gemäß Protokoll vier Wochen lang täglich mit 37,5 mg zwischen 7 und 10 Uhr morgens mit anschließender zweiwöchiger Pause eingenommen. FOLFIRI wurde alle zwei Wochen immer nach der Sunitinibeinnahme über 48 h intravenös verabreicht. Dabei wurde Calciumfolinat mit einer Dosis von 200 mg/m<sup>2</sup> in 250 mL einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung über 2 Stunden und Irinotecan mit einer Dosierung von 180 mg/m<sup>2</sup> in 250 mL NaCl 0,9 % über eine Stunde infundiert. Fluorouracil wurde als i.v.-Bolusinjektion mit einer Dosis von 400 mg/m<sup>2</sup> in 50 mL NaCl 0,9 % und anschließend mit einer Dosis von 2400 mg/m<sup>2</sup> in 250 mL NaCl 0,9 % über 46 Stunden als Dauerinfusion gegeben (Abb. 3.2).

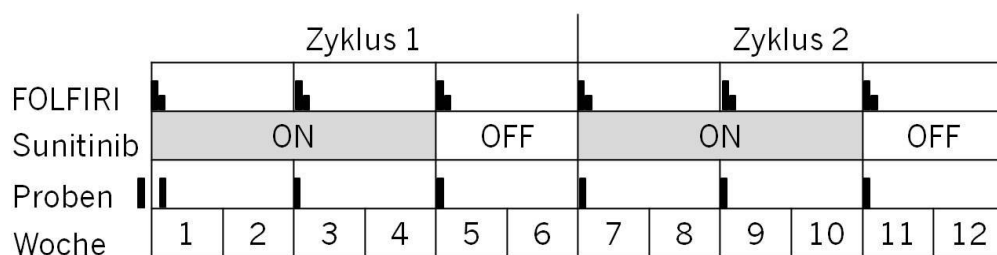


Abb. 3.2 Medikations- und Probeentnahmeschema innerhalb der C-II-005-Studie

Die Sunitinibdosis wurde bei auftretender hämatologischer oder dermatologischer Toxizität oder QT-Zeit-Verlängerung bzw. Arrhythmien auf 25 mg pro Tag reduziert. Bei starker Toxizität wurde die Therapie ausgesetzt und bei Rückgang der unerwünschten Wirkung mit reduzierter Dosierung wieder aufgenommen. Verbesserte sich die Symptomatik nicht, so wurde im Fall hämatologischer Toxizität zusätzlich die Dosis von Irinotecan und Fluorouracil um 30 - 35 % reduziert und im Fall einer dermatologischen Toxizität die Therapie mit Sunitinib wieder aufgenommen und stattdessen die Dosis von Fluorouracil um 30 - 35 % reduziert. Bei einer anderen nicht-hämatologischen Toxizität wurde die Dosis einer der Substanzen in gleicher Weise reduziert. Konnte keine Verbesserung beobachtet werden, wurde die Therapie wieder protokollgerecht aufgenommen und die Dosis einer der anderen Substanzen

herab gesetzt. Dieses Verfahren wurde solange durchgeführt bis die ursächliche Substanz identifiziert war. Aufgrund des Interaktionspotentials führte die gleichzeitige Gabe von Ketoconazol, Ritonavir, Itraconazol, Erythromycin, Clarithromycin oder anderen potenten CYP3A4-Inhibitoren ebenfalls zu einer Dosisreduktion von Sunitinib auf 25 mg/Tag.

Trat nichttolerierbare Toxizität auf, wurde die Therapie des betroffenen Patienten beendet. Betrug die Studiendauer dabei weniger als zwölf Wochen, wurde der Teilnehmer nicht in die Auswertung des primären Endpunkts aufgenommen und durch einen weiteren Patienten ersetzt. Zu der nichttolerierbaren Toxizität, die zur Unterbrechung der Therapie mit einer Substanz von mindestens vier Wochen führte, gehörten toxische Reaktionen, die sich nach vierwöchiger Therapiepause nicht verbesserten und eine hämatologische Toxizität, die trotz Dosisreduktion erneut auftrat. Hämatologische Toxizität wurde dabei definiert als Neutropenie CTCAE-Grad  $\geq 3$ , die länger als sieben Tage andauerte, als neutropenisches Fieber, Thrombozytopenie mit einem CTCAE-Grad 4 oder als Anämie, die nach Dosisreduktion wiederkehrten und nach dem Aussetzen der Sunitinibtherapie zurückgingen.

Bei Nichtauftreten schwerer Toxizität wurde die Therapie bis zur messbaren Tumorprogression fortgeführt. Die endgültige Auswertung der Studie sollte erfolgen, nachdem etwa 80 % der Patienten ein progredientes Tumorwachstum aufwiesen.

Die Therapie wurde zudem vorzeitig beendet, wenn sich der allgemeine Gesundheitszustand verschlechterte, ein Patient seine Einverständniserklärung zurückzog, eine Patientin schwanger wurde, Nonadhärenz festgestellt wurde, der Patient der Nachbeobachtung nicht zur Verfügung stand oder verstarb. Wenn die Behandlung im Rahmen der Studie innerhalb der ersten sechs Wochen beendet wurde, wurde ein weiterer Patient stattdessen in die Studie eingeschlossen [50].

### 3.3.5 Probenentnahme und -aufbereitung

Blutproben zur Bestimmung der Konzentration von Sunitinib, SU12662 und den drei Biomarkern VEGF-A, sVEGFR-2 und sVEGFR-3 wurden einmalig vor Beginn der Therapie zur Bestimmung des Basiswertes und jeweils vor Einnahme von Sunitinib an Tag 2 der ersten Woche, an Tag 1 der dritten, fünften, siebten, neunten, elften und dreizehnten Woche entnommen (Abb. 3.2). Statt des ersten Tages der fünften, elften und dreizehnten Woche, konnte auch der letzte Tag der jeweilig vorangehenden Woche genommen werden. Zur Blutabnahme wurden Sarstedt K-EDTA-Monovetten (10 mL) verwendet. Innerhalb von 30 min wurden die Proben 15 min lang bei etwa 1000 g und

4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend in fünf bis sechs Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei –20 °C oder, wenn möglich, bei –80 °C eingefroren und gelagert.

### 3.3.6 Studiendauer

Die Beobachtungszeit eines Patienten endete protokollgemäß zum Zeitpunkt einer diagnostizierten Tumorprogression, wurde jedoch vorzeitig abgebrochen, wenn der Patient aus anderen Gründen aus der Studie austrat (siehe 3.3.4) [50]. Die Gesamtdauer der Studie betrug dabei vom Tag der ersten Studienmedikation des ersten eingeschlossenen Patienten bis zum Tag, an dem der letzte Patient aus der Studie ausschied, etwa zwei Jahre.

### 3.3.7 Zeit bis zur Progression

Die Zeit bis zur Progression (TTP) war definiert als Zeit vom Tag der ersten Gabe der Studienmedikation bis zu dem Tag, an dem eine Progression festgestellt wurde. Bei Studienabbruch oder Tod, die beide nicht in Zusammenhang mit der Tumorprogression standen, wurde die Zeit des Studienabbruchs oder des Todes als zensierte Zeit in der Analyse berücksichtigt. Konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Abbruch mit dem Fortschreiten der Erkrankung zu tun hatte, wurde die Zeit bis zur letzten gemessenen Progressionsfreiheit als zensierte Zeit behandelt. Trat bei einem Patienten während der gesamten Studie keine Progression auf, wurde der letzte Tag, an dem der Patient unter Studienbedingungen behandelt wurde, als zensierter Zeitpunkt festgelegt. Die Bestimmung der Größe und der Lokalisation der Läsion basierte auf den RECIST-Kriterien [107]. Unter Verwendung entsprechender Kontrastmittel wurden abdominale Computertomographie- (CT) oder MRT-Aufnahmen und CT-Aufnahmen des Brustkorbs gemacht. Die Untersuchungen wurden vor Studienbeginn, nach sechs und zwölf Wochen und anschließend in einem zwölfwöchigen Rhythmus bis zum Fortschreiten der Erkrankung durchgeführt. Bei einem Hinweis auf eine Progression war eine Ultraschalluntersuchung vorgesehen, auf die bei fortbestehendem Verdacht eine CT- oder MRT-Messung zur Verifizierung folgte [50].

## 3.4 Analytik im Plasma

### 3.4.1 Bestimmung von Sunitinib und N-Desethylsunitinib (SU12662)

Die Plasmakonzentrationen von Sunitinib und SU12662 wurden mittels validierter Flüssigkeitschromatographie von Dr. Martina Kinzig am Institut für Biomedizinische

und Pharmazeutische Forschung (IBMP) in Heroldsberg unter der Leitung von Prof. Dr. Fritz Sörgel vermessen. Zur Detektion wurde ein Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer verwendet (LC-MS/MS, Applied Biosystems/MDS Sciex API 5000™ LC-MS/MS). Die untere Bestimmungsgrenze lag bei 0,06 ng/mL, die Präzision zwischen den Tagen jeweils bei 1,6 - 6,1 % und 1,1 - 5,3 % und die analytische Wiederfindung jeweils bei 99,8 - 109,1 % und 99,9 - 106,2 % für Sunitinib und SU12662. Die Wiederfindung über den gesamten Konzentrationsbereich lag entsprechend bei 86,2 % und 84,8 % [108]. Zur Quantifizierung wurde d<sub>5</sub>-Sunitinib als interner Standard verwendet und die Linearität war in einem Bereich von 0,06 bis 100 ng/mL ( $r^2 = 0,999$ ) gegeben [108,109].

### 3.4.2 Bestimmung von VEGF-A und sVEGFR-2

Zur Bestimmung von VEGF-A und sVEGFR-2 in Plasma wurden kommerziell verfügbare Testkits von R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet. Vom Hersteller ermittelte Präzision und Richtigkeit wurde mit Hilfe von Plasmaproben eines Probanden überprüft, um die Validität der Messungen sicherzustellen. Dazu wurde das Plasma mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen rekombinanten Analyten versetzt und in einer Sechsfachbestimmung vermessen. Präzision und Richtigkeit definieren sich jeweils als Variationskoeffizient (CV) und Fehler relativ zur nominalen Konzentration (RE), die aus der Summe der zugesetzten Konzentration und der im reinen Plasma berechnet wird. QC-Proben zur Verifizierung der Kalibrierkurve waren nicht standardmäßig im Testkit enthalten und wurden separat vom Hersteller bezogen. Da in den entsprechenden Analysezertifikaten nur ein Bereich für die Analytkonzentration angegeben ist (Tab. 3.2), wurde laborintern der Mittelwert der ersten drei Messungen als Referenzwert jeder Konzentrationsstufe festgelegt und als „nominaler Wert“ zur Berechnung der Richtigkeit herangezogen. Ein analytischer Lauf galt als valide, wenn die Präzision und Richtigkeit von mindestens zwei Drittel aller QC-Proben und zusätzlich mindestens 50 % jeder Konzentrationsstufe innerhalb von  $\pm 20$  % lagen [59,77,78,81,103,104]. Wurden diese Kriterien nicht erfüllt, wurde die entsprechende Messung wiederholt.

Standard- und QC-Proben wurden in Doppel- und alle Studienproben in Einzelbestimmung vermessen. Es wurden entsprechende Konzentrations-Zeit-Profile beider Biomarker für mCRC-Patienten erstellt. Das Ausmaß der Biomarkerantwort auf die Sunitinibapplikation wurde mit Hilfe der maximalen Veränderung der jeweiligen Konzentration zum Basiswert quantifiziert, wobei der Basiswert definiert war als die Konzentration direkt vor der ersten Sunitinibeinnahme.



Tab. 3.2 Kennwerte für die Messung von VEGF-A und sVEGFR-2 (R&amp;D Systems)

Parameter	VEGF-A	sVEGFR-2
Quantifizierungsbereich	6,4 - 20 000 pg/mL	78,1 - 5000 pg/mL
Qualitätskontrollproben		
1	42 - 119 pg/mL	216 - 370 pg/mL
2	1123 - 2317 pg/mL	1171 - 1920 pg/mL
3	8687 - 14 443 pg/mL	2340 - 3413 pg/mL
Präzision	2,8 - 7,9 %	2,9 - 4,2 %
Richtigkeit	-2 - +10 %	-8 - +4 % <sup>1</sup>

<sup>1</sup>bestimmt in Zellüberstand; keine Daten in Plasma verfügbar

Die Reproduzierbarkeit der Biomarkermessungen wurde mit Hilfe einer zuvor erstellten und implementierten internen Standardarbeitsanweisung (*standard operating procedure*, SOP) für Immunoassays sichergestellt (Appendix 1). Sämtliche Messungen wurden entsprechend der der SOP beigefügten Versuchsprotokolle dokumentiert (Appendix 2).

Für erste Analysen wurde der Mittelwert der gemessenen Konzentrationen der Biomarker gegen die Zeit aufgetragen. Anschließend wurden die Konzentrations-Zeit-Profile nach Zentren getrennt dargestellt, um mögliche zentrumsbedingte Confounder (Störgrößen) aufzudecken.

### 3.4.3 Bestimmung von sVEGFR-3

Für die Bestimmung von sVEGFR-3 in humanem Plasma wurde der zuvor validierte ELISA verwendet. Das Vorgehen wurde in einem Versuchsprotokoll festgehalten, das Bestandteil der internen Standardarbeitsanweisung für Immunoassays ist (Appendix 1). Bei Anbruch eines neuen Testkits wurde der murine anti-humane Anhaftungsantikörper mit 1 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 - 7,4, 0,2 µm sterilfiltriert) auf eine endgültige Konzentration von 4 µg/mL verdünnt. Der anti-humane murine Detektionsantikörper und die Standardproben wurden jeweils mit 1 und 0,5 mL Reagenzien-Verdünnungskonzentrat 1:10 (Herstellung siehe 3.1.2) versetzt, sodass Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 4 bzw. 370 ng/mL entstanden. Entsprechend aliquotierte Antikörper und Standardproben wurden jeweils bei -20 bzw. -80 °C eingefroren und gelagert. Der CrossDown™-Puffer war bei 2 - 8 °C oder -20 °C entsprechend sechs Monate bzw. ein Jahr stabil [110]. Vor jeder Messung wurde die benötigte Menge an Antikörper und Standard-Arbeitslösung aufgetaut und die weiteren

benötigten Reagenzien an den jeweiligen Versuchstagen frisch hergestellt [105]. Alle zu vermessenden Plasmaproben wurden mit CrossDown™-Puffer verdünnt (1:10) und entsprechende Verdünnungsreihen der Standard- und QC-Proben gemäß Versuchsprotokoll (Appendix 2) hergestellt.

Am Tag vor der Messung wurde eine 96-Well-Platte mit 100 µL/Well an Anhaftungsantikörper beschichtet. Nach der Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurde der freie Antikörper-Überstand in drei Waschschritten mit jeweils 340 µL Waschpuffer/Well vorsichtig entfernt. Zum Blockieren der freien Stellen zwischen den auf der Platte fixierten Antikörpern wurden 300 µL an Reagenzien-Verdünnungskonzentrat 2, das zuvor 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt worden war, in jedes Well auf der Platte pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit drei Waschschritten (300 µL/Well) wieder entfernt. Anschließend wurden 100 µL jeder Probe in das für die jeweilige Probe vorgesehene Well pipettiert. Die Platte wurde bei 30 °C für 2 h lichtgeschützt inkubiert, bevor der Überstand aus den Wells ausgewaschen wurde (dreimal mit 300 µL/Well). 100 µL an verdünntem, biotinyliertem murinem anti-humanem Detektionsantikörper wurden in jedes Well gegeben und 2 h bei Raumtemperatur auf einem Rundschtüttler (272 rpm, Umfang: 10 mm) inkubiert. Nach dem folgenden Waschschritt (dreimal mit 300 µL/Well) wurde Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) hinzugegeben (100 µL/Well), für 20 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf dem Schüttler inkubiert und durch Waschen vorsichtig wieder von der 96-Well-Platte entfernt. Für die anschließende Farbreaktion wurden 100 µL einer 1:1-verdünnten Lösung aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in jedes Well pipettiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss wurden 50 µL an 2 N Schwefelsäure zum Abstoppen der Farbreaktion in jedes Well hinzugegeben. Innerhalb der nächsten 30 min wurde die Absorption des von blau zu gelb umgeschlagenen Farbstoffs bei 450 nm und bei 570 nm zur Korrektur der Hintergrundabsorption gemessen. Für jeden Versuch wurde eine Kalibrierkurve basierend auf der 4-PL-Funktion mit GraphPad Prism® 4 erstellt, mit deren Hilfe die Plasmakonzentrationen von sVEGFR-3 in jeder Probe berechnet werden konnten. Zur Beschreibung der Rohdaten, wurde der Median der gemessenen Konzentrationen gegen die Zeit für beide Populationen und innerhalb der Patienten für jedes Studienzentrum separat aufgetragen. Unterschiede der Basiswerte zwischen Probanden und Patienten wurden aufgrund des geringen Datenumfangs parametrisch mit dem t-Test auf statistische Signifikanz getestet.

#### 3.4.4 Einfluss der Zentrifugation auf die Quantifizierung der Biomarker

Neben der validen Quantifizierung eines Biomarkers in der Studienmatrix ist die prä-analytische Probenaufbereitung nach der Entnahme ein wichtiger Teilprozess in der Biomarkervalidierung [62,102]. Da die Daten aus einer multizentrischen Studie stammten, konnten Unterschiede in der Probenaufbereitung nicht ausgeschlossen werden. Basierend auf Ergebnissen aus vorherigen Untersuchungen [97] und Hinweisen aus der Literatur [111] zu VEGF-A erschien insbesondere die Zentrifugation ein kritischer Schritt zu sein. Zur Quantifizierung der prä-analytischen Robustheit der Biomarker gegenüber verschiedenen Zentrifugationsbedingungen wurde der Einfluss der Zentrifuge und der relativen Zentrifugalbeschleunigung (*relative centrifugation force*, rcf) auf die absoluten Konzentrationen von VEGF-A, sVEGFR-2 und sVEGFR-3 untersucht. Dazu wurden die VEGF-A-Plasmakonzentrationen eines Probanden nach Aufbereitung mit zwei verschiedenen Zentrifugen ((1) und (2), siehe 3.1.4) verglichen, wobei die Beschleunigung des Rotors gleichermaßen bei beiden Zentrifugen variiert wurde. Zur Quantifizierung des Einflusses der relativen Zentrifugalbeschleunigung wurde das Plasma von zwei Probanden für VEGF-A und sVEGFR-3 und einem Probanden für sVEGFR-2 bei sechs verschiedenen Vielfachen der Erdbeschleunigung mit der Zentrifuge (1) von den zellulären Bestandteilen des Vollbluts abgetrennt. Basierend auf dem zuvor in einer PK/PD-Analyse von Dr. Andreas Lindauer identifizierten Kovariateneffekt der beiden Zentrifugalbeschleunigungen 780 und 1030 g auf die Basiskonzentration von VEGF-A [97] wurde der Einfluss dieser beiden Zentrifugalbeschleunigungen für die Proben von acht (VEGF-A), sechs (sVEGFR-2) und fünf (sVEGFR-3) Probanden genauer untersucht. Für sVEGFR-3 wurden zudem die Basiskonzentrationen der Studienteilnehmer der beiden Phasen der Probandenstudie (siehe 3.2.9) nach der Zentrifugation mit jeweils 780 oder 1030 g miteinander verglichen [24,97].

Alle Proben wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach dem Auftauen vermessen.

Der Unterschied der Biomarkerkonzentrationen unter Verwendung verschiedener Zentrifugen und/oder Zentrifugalbeschleunigungen wurde grafisch ausgewertet. Die Plasmakonzentrationen der Proben, die mit den beiden ausgewählten Zentrifugalbeschleunigungen aufbereitet wurden, und die Basiskonzentrationen der beiden Phasen der Probandenstudie wurden jeweils aufgrund des geringen Probenumfangs parametrisch mit Hilfe des gepaarten bzw. ungepaarten t-Tests mit der Software GraphPad Prism<sup>®</sup> 4 auf statistische Signifikanz untersucht.

## 3.5 PK/PD-Datenanalyse

### 3.5.1 Nichtlineare Modellierung mit gemischten Effekten

Die nichtlineare Regressionsmethode unter Berücksichtigung von gemischten Effekten (*non-linear mixed effects*, NLME) wird zur Beschreibung und Auswertung von populationspharmakokinetischen und -dynamischen Daten herangezogen. Ein großer Vorteil dieser Methode gegenüber anderen, wie z. B. dem Ansatz des einfachen Datenzusammenfassens (*naive pooled*) oder des Standard-Zwei-Stufen-Verfahrens, ist neben der Abschätzung der typischen Modellparameter die Abschätzung der Variabilität innerhalb der beobachteten Population sowie die Erklärung dieser Variabilität durch entsprechende individuelle Einflussfaktoren (Kovariaten). Während beim Standard-Zwei-Stufen-Verfahren die Anzahl der individuellen Messwerte mindestens der Anzahl der Modellparameter entsprechen sollte, ist die gemeinsame Auswertung der Individuen mit dem Populationsansatz auch mit nur wenigen Datenpunkten pro Individuum möglich [112]. Solche Modelle können mit Hilfe der Software NONMEM® (NONlinear Mixed Effects Modeling) entwickelt werden. Innerhalb der gemischten Effekte unterscheidet man die fixierten (*fixed effects*) und die zufälligen Effekte (*random effects*). Die fixierten Effekte beschreiben quantitativ den Zusammenhang zwischen der unabhängigen Variablen, wie z. B. der Zeit und der Dosis, und der gemessenen Größe (abhängige Variable). Sie sind demnach die Parameter des Strukturmodells, wie z. B. die Clearance und das Verteilungsvolumen oder die Koeffizienten, die entsprechende Kovariateneffekte beschreiben. Sie werden als typische Parameter  $\theta$  für die betrachtete Population berechnet. Zu den zufälligen Effekten gehören die Parameter des statistischen Modells, das die Variabilität der Strukturparameter zwischen den Patienten  $\eta$  (interindividuelle Variabilität, IIV), die Variabilität eines Individuums zwischen verschiedenen Beobachtungseinheiten  $\kappa$  (*Interoccasion-Variabilität*, IOV) und die Restvariabilität  $\varepsilon$  als unerklärbare Differenz zwischen Beobachtung und vorhergesagtem Wert beschreibt [84]. Für jeden Parameter des statistischen Modells wird eine Standardnormalverteilung mit Mittelwert Null und Varianz  $\omega^2$ ,  $\pi^2$  oder  $\sigma^2$  angenommen, die als diagonales Element in den entsprechenden Varianz-Kovarianz-Matrizes  $\Omega$ ,  $\mathbf{K}$  und  $\Sigma$  enthalten sind [113]. Die Regression zur Abschätzung der optimalen Modellparameter basiert auf der Minimierung der Objektiven Funktion (OF) der kleinsten Abweichungsquadrate erweitert um einen Strafterm, der steigende Varianzen beim Minimierungsprozess entsprechend berücksichtigt (*extended least squares objective function*, ELS) (Gl. 3.2).

$$OF_{ELS} = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{(y_i - f(\theta, x_i))^2}{\text{var}(y_i)} + \ln(\text{var}(y_i)) \right] \quad \text{Gl. 3.2}$$

Dabei ist  $N$  die Anzahl der Patienten,  $y_i$  der Vektor der Beobachtungen des  $i$ -ten Individuums,  $f(\theta, x_i)$  der Vektor der entsprechenden Vorhersagen und  $\text{var}(y_i)$  die Varianzmatrix (Gesamtvarianz) der Beobachtungen des  $i$ -ten Individuums. Diese Funktion ist anwendbar zur gleichzeitigen Optimierung von fixierten und zufälligen Effekten [84,113,114]. Da der Einschluss zufälliger Effekte zu Nichtlinearität der Objektiven Funktion führt, kann diese nicht analytisch gelöst werden. In NONMEM® stehen verschiedene iterative Methoden zur Abschätzung der Parameter nichtlinearer Modelle mit gemischten Effekten zur Verfügung.

Die zuerst entwickelte und recht einfache Methode ist die *First-order estimation*- (FO) Methode. Hierbei wird das nichtlineare Modell mit gemischten Effekten zu einer Taylorreihe erster Ordnung mit  $\eta = 0$  abgeleitet. Dabei handelt es sich um eine Annäherung der Funktion an einen bestimmten Punkt  $x$ , indem der Punkt selbst und bei multivariaten Funktionen alle partiellen Ableitungen eines umliegenden Punktes berechnet werden. Der Ordnungsgrad der Taylorreihe gibt an, bis zu welcher Ableitung die Serie fortgeführt wird. Die Modellparameter können so mit einer linearen Annäherung abgeschätzt werden [84]. Da mit  $\eta = 0$  keine Variabilität berücksichtigt wird und nur die Populationsmittelwerte bestimmt werden, muss die interindividuelle Variabilität der Modellparameter  $\eta_i$  anschließend in einer *posthoc*-Abschätzung bestimmt werden. Durch weitere Entwicklung entstand eine Methode, die Populationsparameter und zufällige Effekte simultan berechnen kann. Die Abschätzung von  $\eta_i$  ist dann in jedem Berechnungsschritt durch die entsprechend geltende  $\Omega$ -Matrix bedingt. In diese als *first-order conditional estimation* bezeichneten Methode (FOCE) sind mehrere Optimierungsprozesse integriert [115]. Die FOCE-Methode konnte weiter verbessert werden, indem eine Interaktion (FOCE-I) zwischen  $\eta$  und  $\varepsilon$  zugelassen wird. Beide Parameter werden in Abhängigkeit voneinander abgeschätzt. Eine weitere Methode (LAPLACE) legt den Laplace-Algorithmus zugrunde und beruht ebenfalls auf abhängigen Abschätzungen von  $\eta_i$ . Sie ist sehr akkurat, aber rechenintensiv und insbesondere für Modelle mit hoher Nichtlinearität geeignet. Daher wird dieser Algorithmus in der Regel bei pharmakodynamischen Modellen mit ordinalen und kategorialen Daten und somit auch bei Überlebens- oder Progressionszeiten eingesetzt. Je mehr Beobachtungen pro Individuum vorliegen und je größer die inter- und intraindividuelle Variabilität und damit die Nichtlinearität ist,

desto mehr unterscheiden sich die Ergebnisse der drei vorgestellten Methoden voneinander [84].

### 3.5.2 Modellentwicklung

#### *Strukturmodell*

Die Modelle wurden schrittweise aufgebaut. Zu Beginn wurde das Strukturmodell, das den generellen Kurvenverlauf der Daten beschreibt, ausgehend von den zuvor für Probanden entwickelten Modellen für Sunitinib, SU12662 und sVEGFR-2 [24,97] identifiziert. Kovariaten, als individuelle Einflussfaktoren auf die Modellparameter, können einen Teil der Variabilität zwischen den Individuen erklären und gehören somit ebenfalls in das Strukturmodell [84]. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit bei Fallzahlen  $< 50 - 100$ , eine falsche Kovariate einzuschließen (Selektionsbias) oder den Effekt zu überschätzen, sehr hoch und damit die Entscheidung schwierig, ob es sich um eine Kovariate mit starkem Effekt oder um eine schwache Kovariate handelt, die fälschlicherweise überschätzt wird [116]. Aus diesem Grund wurde keine Kovariatenanalyse durchgeführt. Die Auswahl des besten Strukturmodells basierte dabei auf den in 3.5.3 definierten Evaluierungskriterien.

#### *Interindividuelle Variabilität*

Neben der Abschätzung der typischen Modellparameter kann mit Hilfe der NLME-Modellierung auch die Variabilität zwischen den Individuen berechnet werden. Da die Modellparameter nur positive Werte annehmen können und diese oft rechtsschief verteilt sind, wird in der Regel ein exponentielles Modell verwendet (Gl. 3.3).

$$\theta_i = \theta_{\mu} \cdot e^{\eta_i} \quad \text{Gl. 3.3}$$

$\theta_i$  stellt dabei den abgeschätzten Modellparameter des  $i$ -ten Individuums und  $\theta_{\mu}$  den Populationsmittelwert dar.  $\eta_i$  ist die individuelle Abweichung vom Mittelwert mit  $N(0, \omega^2)$ . Die Varianz  $\omega^2$  befindet sich in der logarithmischen Domäne, kann jedoch trotzdem durch Ziehen der Quadratwurzel näherungsweise in den Variationskoeffizienten mit gleicher Skalierung umgerechnet werden. Eine genauere Berechnung ist aufgrund der hohen Unsicherheit in der Abschätzung der Variabilität nicht gerechtfertigt. Die Varianzen sind auf der Diagonalen der Varianz-Kovarianz-Matrix zu finden. Die Variabilitäten einiger Modellparameter können jedoch auch untereinander korrelieren. In diesem Fall werden entsprechende Kovarianzen in die  $\Omega$ -Matrix integriert. Diese befinden sich dann in den Bereichen außerhalb der Diagonale. Kovarianz  $\omega_{\text{Par1,Par2}}$  und Korrelation  $\rho$  stehen dabei über die Varianzen beider Parameter (Par) in Beziehung (Gl. 3.4).

$$\rho = \frac{\omega_{\text{Par1,Par2}}}{\sqrt{\omega_{\text{Par1}}^2 \cdot \omega_{\text{Par2}}^2}} \quad \text{Gl. 3.4}$$

### *Interoccasion-Variabilität*

Bei der Beschreibung pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Daten werden häufig Veränderungen der Profile über die Zeit beobachtet, die durch unterschiedliche Faktoren bedingt sein können, die z.T. nicht erklärbar sind. Diese Unterschiede zwischen einzelnen Beobachtungseinheiten können als *Interoccasion-Variabilität* (IOV) in das Modell integriert werden. Zur Abschätzung der IOV müssen innerhalb der definierten Beobachtungseinheiten ausreichend Daten zur Verfügung stehen. In NONMEM® ist die IOV zusammengefasst mit der Residualvariabilität, die folglich aufgrund gleich bleibender Gesamtvariabilität steigt, wenn eine IOV im Modell nicht berücksichtigt wird [84,117]. Simulationen ohne Berücksichtigung der IOV zeigen, dass die Abschätzung der Strukturparameter mit systematischen Fehlern behaftet sein kann. Eine im Vergleich zur IIV große IOV führt dabei eher zu einem Bias in der Abschätzung der entsprechenden IIV als eine vergleichsweise niedrige IOV. Unter der Annahme, dass die IOV nur die Variabilität der Daten beeinflusst und nicht eine Folge sich unterscheidender Bedingungen zwischen den Beobachtungseinheiten ist, ist die IOV neben der IIV Bestandteil der Variabilität der Modellparameter (Gl. 3.5).

$$\theta_i = \theta_\mu \cdot e^{\eta_i + \text{OCC}_1 \cdot \kappa_1 + \dots + \text{OCC}_n \cdot \kappa_n} \quad \text{Gl. 3.5}$$

Dabei ist  $\eta_i$  die IIV und  $\kappa$  die Variabilität der entsprechenden Beobachtungseinheit 1 bis  $n$  mit  $N(0, \pi^2)$ . Es wird der Kovariaten  $\text{OCC}_n$  der Wert 1 zugewiesen, die der Beobachtungseinheit  $n$  zugewiesen wird, alle anderen nehmen zu diesem Zeitpunkt hingegen den Wert 0 an [117].

### *Restvariabilität*

Ein Teil der beobachteten Variabilität kann weder durch die IIV noch durch die IOV erklärt werden. Ursachen für die sogenannte Restvariabilität können z. B. intraindividuelle Schwankungen, Fehlspezifikationen des Modells, Fehler der analytischen Methode oder eine unbekannte Dosierungshistorie sein [84,117]. Es stehen verschiedene Modelle zur Beschreibung der Restvariabilität zur Verfügung, wobei insbesondere das additive (Gl. 3.6), das proportionale (Gl. 3.7) und das aus beiden kombinierte Fehlermodell (Gl. 3.8) Verwendung finden.

$$y_{ij} = f(\theta, x_i) + \varepsilon_{\text{add}} \quad \text{Gl. 3.6}$$

$$y_{ij} = f(\theta, x_i) \cdot (1 + \varepsilon_{\text{prop}}) \quad \text{Gl. 3.7}$$

$$y_{ij} = f(\theta, x_i) + f(\theta, x_i) \cdot \varepsilon_{\text{prop}} + \varepsilon_{\text{add}} \quad \text{Gl. 3.8}$$

Dabei ist  $y_{ij}$  die  $j$ -ste Beobachtung des  $i$ -ten Individuums,  $f(\theta, x_i)$  die vorhergesagte Konzentration und  $\varepsilon$  der Residualfehler definiert als zufällige Variable mit Mittelwert 0 und Varianz  $\sigma^2$  [84,113]. Beim additiven Fehlermodell ist der absolute Fehler konstant und daher vor allem bei Daten, die einen geringen Konzentrationsbereich einschließen, von Bedeutung. Das proportionale Fehlermodell hingegen geht von einem konstanten Variationskoeffizienten aus, wie es auch oft für analytische Methoden zu beobachten ist, und ist damit auch für größere Konzentrationsspannen geeignet. Der proportionale Fehler entspricht dabei dem Variationskoeffizienten und der additive der Standardabweichung. Da in den oben beschriebenen Modellen der Fehler als zufälliger Effekt beschrieben wird, sind die Ergebnisse nicht einfach interpretierbar. Aus diesem Grund wurden insbesondere bei Verwendung des kombinierten Fehlermodells (siehe Gl. 3.8) CV und SD als fixierte Effekte und damit als direkt interpretierbare Werte modelliert (Gl. 3.9).

$$y_{ij} = f(\theta, x_i) + \sqrt{f(\theta, x_i)^2 \cdot \theta_{\text{CV}}^2 + \theta_{\text{SD}}^2} \quad \text{Gl. 3.9}$$

Der additive Teil fällt dabei insbesondere bei niedrigen Konzentrationen und der proportionale bei höheren Konzentrationen ins Gewicht. Da mit diesem Modell beide Randbereiche berücksichtigt werden, erscheint das kombinierte Fehlermodell in den Fällen mit großer Konzentrationsspanne am geeignetsten zu sein [84].

### 3.5.3 Modellevaluierung

Ein Modell sollte entsprechend der voraussichtlichen Anwendbarkeit evaluiert werden. Dabei wird bei Modellen, die vornehmlich zur Beschreibung typischer Modellparameter und entsprechender Variabilität in einer bestimmten Population dienen, eine weniger strenge Modellevaluierung erwartet als bei Modellen, die für Simulationen und Dosisempfehlungen verwendet werden sollen [86,88,89]. Es stehen verschiedene numerische und grafische Methoden zur Modellevaluierung zur Verfügung. Dazu gehören die Objektive Funktion, mit deren Hilfe abhängige Modelle verglichen werden können [118] und verschiedene grafische Methoden zur Beurteilung der Anpassungsgüte [88,89,118].



### Objektive Funktion

Die erweiterte Objektive Funktion der kleinsten Abweichungsquadrate ( $OF_{ELS}$ ), die dem Optimierungsprozess von NONMEM<sup>®</sup> unterliegt, entspricht der Maximum-Likelihood-Methode unter der Voraussetzung einer Normalverteilung von  $\eta_i$  [84,119]. Hierbei werden die Modellparameter  $\theta$  ermittelt, die die Daten mit größter Wahrscheinlichkeit bestmöglich beschreiben und damit die Maximum-Likelihood-Funktion maximieren. Aus technischen Gründen wird der mit minus zwei multiplizierte natürliche Logarithmus der Likelihood-Funktion ( $-2LL$ ) verwendet, der während des Optimierungsverfahrens minimiert wird. Für zwei zusammenhängende Modelle kann somit der Likelihood-Ratio-Test (LRT) zur Beurteilung der Anpassungsgüte (*Goodness-of-fit*, GOF) angewendet werden. Dabei unterscheiden sich die beiden Modelle dahingehend, dass das volle Modell durch das Fixieren eines neu abzuschätzenden Parameters in ein reduziertes Modell überführt werden kann. Zur Überprüfung der Hypothese, dass das volle Modell die Beobachtungen besser beschreibt als das reduzierte Modell, wird der Quotient aus der Likelihood des reduzierten und der des vollen Modells oder die Differenz der  $-2LL$  gebildet (Likelihood-Ratio) (Gl. 3.10).

$$LRT = -2LL_{red} - (-2LL_{voll}) \quad \text{Gl. 3.10}$$

Die Differenz der  $-2LL$  ist annähernd  $\chi^2$ -verteilt mit Freiheitsgraden entsprechend der Anzahl der zusätzlichen Parameter im vollen Modell. Bei einem Freiheitsgrad sind zwei Modelle mit einem Signifikanzniveau von 0,05 bzw. 0,01 bei einer Differenz der Werte der Objektiven Funktion (*objective function value*, OFV) von 3,84 bzw. 6,63 statistisch signifikant unterschiedlich. Für den Einschluss zweier weiterer Parameter ist das volle Modell bei einer Verminderung des Wertes der Objektiven Funktion ( $\Delta OFV$ ) entsprechend um 5,99 bzw. 9,21 statistisch signifikant besser als das reduzierte Modell [84,113].

### Shrinkage-Effekte

Die Abschätzungen der individuellen Parameter sind stark abhängig von der Qualität der Daten. Liegt eine datenarme Situation vor und sind die Daten wenig informativ, wird die Varianz der  $\eta$ -Verteilung sehr klein und die empirischen Bayes-Abschätzungen (*empirical Bayes estimates*, EBE) nähern sich dem Populationsmittelwert an. Dieses Phänomen wird als  $\eta$ -Shrinkage bezeichnet (Gl. 3.11) [120]. In gleicher Weise nähern sich die individuell vorhergesagten Konzentrationen (IPRED) den Beobachtungen an und scheinen somit ideal abgeschätzt worden zu sein. Diese Überanpassung kann mit Hilfe des  $\varepsilon$ -Shrinkage identifiziert und quantifiziert werden und lässt sich aus der

Standardabweichung der individuell gewichteten Residuen (IWRES) berechnen (Gl. 3.12) [118,120].

$$\eta - \text{Shrinkage} = \frac{1 - \text{SD}(\eta)}{\omega} \quad \text{Gl. 3.11}$$

$$\varepsilon - \text{Shrinkage} = 1 - \text{SD}(\text{IWRES}) \quad \text{Gl. 3.12}$$

Dabei ist  $\omega$  die Standardabweichung der Parameterabschätzungen für verschiedene Individuen. Neben der Verkleinerung der Varianzen, kann sich auch die Verteilung verändern. Unterscheidet sich jedoch der Mittelwert der abgeschätzten individuellen zufälligen Effekte, der  $\eta$ s, nicht signifikant von Null und bleiben die Shrinkage-Effekte unterhalb von 20 %, sind Modellfehlspezifikationen eher unwahrscheinlich [120]. Der entsprechende p-Wert und die Berechnungen der Shrinkage-Effekte werden in jedem Lauf von NONMEM® berechnet.

#### *Bootstrap-Verfahren*

Bei großen Datensätzen werden die Daten in der Regel in einen Modellentwicklungs- (2/3) und einen Modellevaluierungsdatensatz (1/3) aufgeteilt. Das Bootstrap-Verfahren ermöglicht eine Modellevaluierung auch dann, wenn bei einer geringen Fallzahl der vollständige Datensatz mit allen Patienten für die Modellentwicklung verwendet wurde [88]. Mit Hilfe dieser Methode kann die Präzision der Modellparameter als nichtparametrisches Konfidenzintervall ermittelt werden. Diese Methode basiert auf der zufälligen Ziehung eines Patienten aus dem Originaldatensatz mit anschließendem Zurücklegen. Es werden so viele Patienten gezogen, wie im Originaldatensatz enthalten sind. Jeder Patient kann somit mehrfach oder auch gar nicht im neuen Datensatz aufzufinden sein. Dieses Verfahren wurde insgesamt 1000-mal durchgeführt, sodass 1000 Datensätze mit je 21 Patienten entstanden, die als Grundlage einer neuen Parameterabschätzung dienten. Aus allen 1000 Abschätzungen wurden aus den erfolgreich beendeten Läufen das 5-te und das 95-ste Perzentil zur Berechnung des 90 %-Konfidenzintervalls der Modellparameter verwendet ohne, dass die Verteilung der Parameter bekannt sein musste [84]. Das Bootstrap-Verfahren wurde automatisiert mit Hilfe von PsN (*Pearl speaks NONMEM*, Version 3.2.4) durchgeführt [98].

#### *Grafiken zur Beschreibung der Anpassungsgüte*

Zur Untersuchung von Modellfehlspezifikationen werden häufig grafische Evaluierungsmethoden verwendet. Dabei wurden zur Untersuchung der zentralen Tendenz

- die vorhergesagten (PRED) gegen die beobachteten Konzentrationen (OBS) aufgetragen. Die Identitätslinie gibt dabei den idealen Verlauf der Punkte an.

Zur Berücksichtigung der interindividuellen Variabilität wurden die

- individuell vorhergesagten Konzentrationen (IPRED) gegen die beobachteten Konzentrationen (OBS)

dargestellt. Dieses diagnostische Verfahren ist nur dann zur Identifizierung von Modellfehlspezifikationen geeignet, wenn die Daten ausreichend informativ sind, d.h. keine Shrinkage-Phänomene zu beobachten sind (siehe 3.5.3).

Zur Untersuchung der Verteilung der Residuen wurden

- Individuell gewichtete Residuen (IWRES) gegen die individuellen Vorhersagen (IPRED)

jeder j-ten Beobachtung jedes i-ten Individuums aufgetragen. Als Wichtungsfaktor diente in diesem Fall die durch das Residualfehlermodell gegebene Standardabweichung  $\sigma$  (Gl. 3.13).

$$IWRES_{ij} = \frac{OBS_{ij} - IPRED_{ij}}{\sigma} \quad \text{Gl. 3.13}$$

Sowohl die Residuen (RES) zwischen Beobachtungen und Vorhersagen als auch die IWRES sind nur begrenzt zur Identifizierung von Modellfehlspezifikationen geeignet [118]. Die gewichteten Residuen (WRES) können dagegen für diesen Zweck besser genutzt werden. Da die WRES jedoch immer mit der FO-Methode, auch bei verwendeter FOCE-Methode, berechnet werden, können Modellfehlspezifikationen bei falsch berechneten WRES nicht erkannt werden. Die vergleichbaren gewichteten Residuen bei Verwendung der FOCE-Methode sind die konditional gewichteten Residuen (CWRES). Diese entsprechen der Wurzel des ersten Terms der  $OF_{ELS}$  (Gl. 3.14).

$$CWRES = \frac{y_i - f_{FOCE}(\theta, x_i)}{\sqrt{\text{var}_{FOCE}(y_i)}} \quad \text{Gl. 3.14}$$

Damit gehen die mittels FOCE angenäherten individuellen Bayes-Abschätzungen und die Residualvarianz in die Berechnung ein. Die CWRES sind daher der bessere diagnostische Parameter.

Zur Modellevaluierung wurden

- die CWRES gegen die Zeit oder die Zeit nach der Arzneistoffeinnahme (*time after dose*, TAD)

aufgetragen [118,121]. Diese diagnostischen Abbildungen wurden mit Xpose (Version 4.2.1, 2010) standardmäßig nach jedem Modelllauf in NONMEM® generiert [122].

### Visual Predictive Check

Im Vergleich zu den anderen grafischen Evaluierungsmethoden basiert der *Visual Predictive Check* (VPC) auf simulierten Vorhersagen des finalen Modells, für die fixierte und zufällige Effekte sowie Residualvariabilität berücksichtigt werden [123]. Für jeden VPC wurden 1000 Simulationen mit dem finalen Modell durchgeführt. Der mediane Konzentrations-Zeit-Verlauf und das entsprechende 90 %-Vorhersageintervall basierend auf dem 5-ten und 95-ten Perzentil der Simulationen wurden zusammen mit den beobachteten Konzentrationen dargestellt. Aufgrund der Heterogenität der Probenentnahmezeitpunkte und der tatsächlichen Einnahmedauer von Sunitinib wurden für die Darstellung des VPC nur Daten des ersten Zyklusses dargestellt. Da die vorhergesagten Konzentrationen und das Ausmaß der Biomarkereffekte dosisabhängig sind, wurden nur Patienten mit gleicher Dosierung in einem VPC zusammen dargestellt. Daher wurden alle Patienten mit Dosisreduktion oder Therapiepause innerhalb des ersten Zyklusses ab dem Zeitpunkt der Therapieänderung aus der visuellen Modellevaluierung ausgeschlossen (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Patienten, die vorzeitig aus der Modellevaluierung mittels VPC ausgeschlossen wurden

Patienten-ID	Ausschluss-Zeitpunkt [h]	Ursache
01-04	384	Dosisreduktion
02-06	240	Therapieende
02-08	336	Therapieende
02-10	360	Therapieende
03-01	504	Therapieende
03-03	648	Therapiedauer länger
04-01	600	Therapiepause

Die Auswertung des VPC wurde visuell vorgenommen. Dabei sollten die simulierten Daten im Median die zentrale Tendenz der beobachteten Daten wiedergeben, von denen 90 % innerhalb des Vorhersagebereichs liegen sollten. Die Simulationen zur Erstellung eines VPC des finalen Modells wurden mit der Software PsN und die anschließende grafische Darstellung mit Xpose durchgeführt.

### 3.5.4 Sensitivitätsanalyse

Mit Hilfe einer Sensitivitätsanalyse kann die Empfindlichkeit der Modellabschätzung auf Veränderungen kritischer Einflussgrößen, insbesondere die dem Modell zugrunde liegenden Annahmen, untersucht werden [86].

#### *Einfluss fixierter Modellparameter*

Da aufgrund fehlender Informationen Modellparameter auf bestimmte Werte festgelegt wurden, wurde deren Einfluss auf die Modellparameterabschätzung untersucht. Zur Quantifizierung des Effekts wurde der relative Vorhersagefehler (*relative prediction error*, RPE) als relative Differenz der abgeschätzten Modellparameter  $\theta_i$  zu den ursprünglichen Abschätzungen  $\theta_{\text{Ref}}$  nach der systematischen Veränderung der fixierten Modellparameter angegeben. Die Parameter wurden dabei auf  $k$  verschiedene Werte zwischen  $-50$  und  $+50$  % der ursprünglichen Werte fixiert [84,124] (Gl. 3.15).

$$\text{RPE, \%} = \frac{\theta_{ik} - \theta_{\text{Ref}}}{\theta_{\text{Ref}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.15}$$

#### *Einnahmezeitpunkt*

Im Rahmen der C-II-005-Studie wurde der Einnahmezeitpunkt von Sunitinib nicht dokumentiert und war damit unbekannt. Aufgrund dessen wurde für die Modellentwicklung angenommen, dass Sunitinib täglich morgens um 8 Uhr eingenommen wurde. Mit Hilfe einer Sensitivitätsanalyse wurde der Einfluss des Dosierungszeitpunkts auf die Abschätzung der Modellparameter untersucht und quantifiziert [84,86,125]. Dazu wurden Simulationen der Dosierungszeit basierend auf den Angaben des Studienprotokolls gemacht, in dem festgelegt worden war, dass die Sutent<sup>®</sup>-Tabletten morgens zwischen 7 und 10 Uhr eingenommen werden sollten [50]. Ausgehend von einer protokollkonformen Einnahme mit voller Adhärenz wurde ein Dosierungszeitpunkt zufällig mit stetiger Gleichverteilung [84,125] simuliert, sodass dieser zwischen 7 und 10 Uhr lag. Auf diese Weise wurden insgesamt 50 Datensätze simuliert, die als Grundlage für neue Modellabschätzungen innerhalb der Sensitivitätsanalyse dienen [84,125]. Zur Quantifizierung der Empfindlichkeit des Modells hinsichtlich des Zeitpunkts der Sunitinibeinnahme innerhalb des im Studienprotokoll vorgesehenen Zeitfensters auf die Abschätzung der Modellparameter wurde der Bias (*mean prediction error*, ME) (Gl. 3.16) und die Präzision bezogen auf den Referenzwert (*root mean squared prediction error*, RMSE) (Gl. 3.17) berechnet. Zur Beurteilung des Bias wurde die Streuung in Form des 95 %-Konfidenzintervalls zusätzlich angegeben [126,127].

$$ME, \% = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n RPE_i \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.16}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n RPE_i^2} \quad \text{Gl. 3.17}$$

Mit Hilfe der Bayes-Abschätzungen wurde der Einfluss auf das Individuum untersucht. Dazu wurden Bias und Präzision für jedes Individuum und jeden Parameter berechnet und der mittlere Effekt mit Hilfe des Mittelwertes und des 95 %-Konfidenzintervalls quantifiziert.

Die Simulationen der Dosierungszeitpunkte und die Berechnung von Mittelwert und Konfidenzintervall wurden mit Hilfe der Software R<sup>®</sup> durchgeführt. Diese Analyse wurde aufgrund der zeitaufwendigen Berechnung nur für das pharmakokinetische und das PK/PD-Modell von sVEGFR-2 durchgeführt.

### 3.6 Pharmakokinetisches Modell

Als Grundlage für das pharmakokinetische Modell für Sunitinib und seinen aktiven Metaboliten SU12662 diente das von Dr. Andreas Lindauer zuvor für Probanden entwickelte Modell [97]. Da im Rahmen dieser Untersuchung keine Daten direkt nach der Sunitinibapplikation zur Verfügung standen, wurden die Parameter, die die Absorptionsphase beschreiben, auf die für die Gesunden abgeschätzten Werte fixiert [124]. Dazu gehörten die Anzahl der Transitkompartimente (N) und die mittlere Transitzeit (MTT) zur Beschreibung der verzögerten Absorption, das Verhältnis zwischen präsystemischer und systemischer Metabolisierung (RPS) und die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante (KA), die den Transfer vom Absorptionskompartiment in die entsprechenden zentralen Kompartimente von Sunitinib und SU12662 beschreibt. Ausgehend von diesem Modell wurde ein Zwei-Kompartiment-Modell auch für SU12662 getestet. Interindividuelle Variabilität wurde für die Modellparameter integriert, wenn deren Ausschluss zu einer signifikanten Verschlechterung des Modells führte. Zur Modellierung der Residualvariabilität wurden das proportionale und das kombinierte Fehlermodell getestet.

Der Einfluss aller im Modell fixierten Parameter wurde in einer Sensitivitätsanalyse, in der die Parameter in 10 %-Schritten von -50 bis +50 % des Ausgangswertes variiert wurden, untersucht.

### 3.7 Pharmakokinetische/pharmakodynamische Modelle

Die pharmakokinetischen/pharmakodynamischen Modelle beider löslichen Rezeptoren wurden in einem sequentiellen Ansatz entwickelt. Individuelle Abschätzungen der pharmakokinetischen Parameter wurden mit Hilfe des finalen PK-Modells generiert und in den Datensatz zur Erstellung des pharmakodynamischen Teils des PK/PD-Modells integriert.

Als Grundlage für das PK/PD-Modell zur Beschreibung des Konzentrations-Zeit-Profiles von sVEGFR-2 wurde das zuvor für Probanden entwickelte Modell verwendet [97]. Da beide Biomarker korrelierten (siehe 4.5), diente dieses Modell ebenfalls als Basis für die Entwicklung des Modells für sVEGFR-3. Dabei wurde die vor Therapiebeginn konstante Biomarkerkonzentration mit Hilfe eines dynamischen Gleichgewichts mit einer Bildungsrate nullter ( $k_{in}$ ) und einer Eliminationsrate erster Ordnung ( $k_{out}$ ) dargestellt. Die inhibierende Wirkung der aktiven freien Substanz, definiert als Summe der ungebundenen Konzentration von Sunitinib und SU12662 ( $AC_{ub}$ ), wurde mit einer hyperbolischen Funktion (INH) beschrieben (Gl. 3.18).

$$INH = \frac{AC_{ub}}{K_d + AC_{ub}} \quad \text{Gl. 3.18}$$

Die Dissoziationskonstante  $K_d$  wurde dabei auf den *in vitro* ermittelten Wert fixiert [38]. Zur Beschreibung der abnehmenden Biomarkerkonzentrationen nach Beginn der Sunitinibtherapie wurden PK und PD mit einem indirekten Response-Modell mit hemmendem Effekt ( $SIG_x$ ) auf die Bildungsrate  $k_{in}$  verknüpft (Gl. 3.19).

$$\frac{dC_{sVR}}{dt} = k_{in} \cdot SIG_x - k_{out} \cdot C_{sVR} \quad \text{Gl. 3.19}$$

$C_{sVEGFR}$  ist dabei die Konzentration von sVEGFR-2 oder sVEGFR-3 und  $SIG_x$  die hemmende Komponente, der in diesem Fall entweder ein invers-lineares Modell ( $SIG_{inv.lin.}$ ) oder ein  $E_{max}$ -Modell ( $SIG_{E_{max}}$ ) zugrunde gelegt wurde. Zur Beschreibung der sVEGFR-2-Konzentrationen wurde dabei das invers-lineare Modell verwendet (Gl. 3.20) [97]:

$$SIG_{inv.lin.} = \frac{1}{1 + \alpha \cdot INH} \quad \text{Gl. 3.20}$$

Dabei stellt  $\alpha$  die intrinsische Aktivität der Substanz dar, mit deren Hilfe der maximale Effekt auf den entsprechenden löslichen Rezeptor beschrieben werden kann [86,97]. Für sVEGFR-3 wurde zudem das klassische sigmoidale  $E_{max}$ -Modell (Gl. 3.21) getestet, in dem der maximal mögliche hemmende Effekt auf die Bildungsrate durch  $E_{max}$  charakterisiert wird:

$$\text{SIG}_{E_{\max}} = 1 - (E_{\max} \cdot \text{INH}) \quad \text{Gl. 3.21}$$

Interindividuelle Variabilität wurde integriert, wenn sich das Modell nach Ausschluss der entsprechenden IIV statistisch signifikant verschlechterte. Zur Untersuchung potentieller zyklusabhängiger Variabilität der Basiskonzentrationen, die insbesondere für sVEGFR-2 beobachtet worden ist (siehe 4.2.2), wurde der Einfluss des Zyklusses als Interoccasion-Variabilität getestet. Aus Gründen der Einfachheit wurde von einer gemeinsamen Variabilität zwischen den einzelnen Beobachtungseinheiten (Zyklus) mit  $\pi_1^2 = \pi_2^2$  ausgegangen [84].

### 3.8 Korrelationsanalyse

Da sowohl sVEGFR-2 als auch sVEGFR-3 an der Angiogenese und Tumorangione beteiligt sind [5], wurde mit Hilfe einer Korrelationsanalyse untersucht, wie hoch die Korrelation zwischen den Konzentrationen der beiden Biomarker ist [84]. Zur Bestimmung des quantitativen Zusammenhangs wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Dabei wurde angenommen, dass die Daten normalverteilt waren und in einem linearen Zusammenhang standen [94]. Da physiologische Größen in der Regel diese Voraussetzungen nicht erfüllen, wurde neben der Korrelationsanalyse nach Pearson auch eine Rangkorrelation durchgeführt, bei der beide Voraussetzungen außer Acht gelassen werden. Die Methode nach Spearman ist die am häufigsten verwendete Rangkorrelationsanalyse und eignet sich für metrische Daten mit monotonem Zusammenhang [94]. Es wurde die Korrelation zwischen den gemessenen Konzentrationen der beiden Biomarker sVEGFR-2 und sVEGFR-3 und die der entsprechenden Konzentrationen bezogen auf den individuellen Basiswert mit dem 95 %-Konfidenzintervall für Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom als auch für Probanden berechnet. Eine lineare Regression wurde durchgeführt, um mit Hilfe des Ordinatenabschnitts und der Steigung die Konzentrationen beider Biomarker zu vergleichen. Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  diente dazu, den Anteil der durch das Modell erklärten Variabilität zu quantifizieren [94]. Die Korrelations- und Regressionsanalyse wurde mit Hilfe von GraphPad Prism® 4 durchgeführt.

### 3.9 Simulationsstudie zur optimalen Probeentnahme

Aus der Literatur ist bekannt, dass die individuelle Pharmakokinetik von Sunitinib und SU12662 [128] sowie die Basiskonzentration von sVEGFR-2 oder sVEGFR-3 [19,68,69,74,99] oder die maximale Veränderung [19,67-69] zu dieser prädiktiv für



ein Therapieansprechen bei verschiedenen Tumoren ist. Da einzelne Messungen den individuellen Konzentrations-Zeit-Verlauf nur unzureichend wiedergeben können, werden in solchen Fällen entsprechende PK- und PK/PD-Modelle zu Hilfe genommen. Allerdings sollten die individuellen Bayes-Abschätzungen mit hinreichender Präzision und akzeptablem Bias berechnet werden können. Zur Untersuchung der optimalen Zeitpunkte für eine Probenentnahme zur präzisen Abschätzung der Clearance von Sunitinib ( $CL_{Su}$ ) und SU12662 ( $CL_{Met}$ ) und der AUC der ungebundenen, aktiven Substanz nach sechs Wochen ( $AAUC_{ub,0-1008h}$ ) wurde eine Simulation durchgeführt. Dazu wurden die Daten von 1000 Patienten simuliert, die eine Therapie mit 37,5 mg/Tag Sunitinib für vier Wochen und anschließender zweiwöchiger Pause erhielten. Vier verschiedene Entnahmezeitpunkte (24 h, zwei, vier und sechs Wochen nach Therapiebeginn) wurden in allen möglichen Kombinationen – bestehend aus einer, zwei, drei oder vier Proben pro Patient – untersucht und verglichen. Für jedes Entnahmeschema wurden die Bayes-Abschätzungen der ausgewählten pharmakokinetischen Parameter zur Berechnung des Bias (ME, siehe Gl. 3.16) und der Präzision (RMSE, siehe Gl. 3.17) herangezogen [126]. Die individuellen Bayes-Abschätzungen bei einem Schema mit täglicher Probenentnahme dienten dabei als Referenz. Zusätzlich wurden *Goodness-of-fit*-Grafiken erstellt, in denen die Abschätzungen eines jeden Schemas gegen die der Referenz aufgetragen und visuell ausgewertet wurden.

Unter Berücksichtigung der Umsetzbarkeit in die klinische Praxis, in die vier und auch drei Proben pro Patient und Zyklus schwierig zu integrieren sind, wurden insbesondere die Schemata mit zwei Proben pro Zyklus verglichen.

Stellvertretend für beide Biomarkermodelle wurde nur das PK/PD-Modell für sVEGFR-2 untersucht, da beide Modelle ähnlich waren und keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Anpassungsgüte zu erwarten waren.

Aufgrund des sequentiellen Ansatzes wirkten sich fehlerbehaftete Abschätzungen der pharmakokinetischen Parameter auf die Parameter des PK/PD-Modells aus. Daher wurden in jede Simulation des PK/PD-Modells die individuellen Ergebnisse der PK-Simulation mit gleichem Entnahmeschema integriert. Zur Beurteilung der Anpassungsgüte wurden der Basiswert ( $BL_{sVEGFR2}$ ) und die AUC nach sechs Wochen ( $AUC_{sVEGFR2,0-1008h}$ ) herangezogen.

Die Simulationen wurden mit der Software NONMEM<sup>®</sup>, die statistische Auswertung und die grafischen Darstellungen mit der Software R<sup>®</sup> durchgeführt.

### 3.10 Überlebenszeitanalysen

In der C-II-005-Studie war die Zeit bis zur Progression (TTP) als primärer Endpunkt definiert, mit deren Hilfe der klinische Benefit nach einer Intervention untersucht werden kann [94]. Einer der wichtigsten Punkte in der Analyse der Überlebens- oder Progressionszeiten ist die Berechnung der entsprechenden Überlebensfunktion unter Einschluss prädiktiver Kovariaten. In klassischen Überlebenszeitanalysen wird die Zeit bis zur Progression mit  $T_i$  und die Zeit bis zum Ende der Beobachtung mit  $C_i$  bezeichnet. In die Auswertung geht dann die zuerst erreichte Zeit  $Y_i$  ein,  $Y_i = \min(T_i, C_i)$  [129]. Tritt bis zum Zeitpunkt  $C_i$  keine Progression auf und gilt daher  $Y_i = C_i$ , so wird dieser Punkt als rechts-zensiert bezeichnet. Hier ist unbekannt, was nach Ende der Beobachtungszeit passiert.

Da Verzerrungen des Ergebnisses zu erwarten sind, wenn Daten aus der Auswertung ausgeschlossen werden, müssen besondere Verfahren angewendet werden, um zensierte Daten in der Analyse berücksichtigen zu können [94]. Mit Hilfe des Zensierungsindikators  $\delta_i$  wird zwischen Progression ( $\delta=1$ ) und Zensur ( $\delta=0$ ) unterschieden. Die Progressionszeit kann von verschiedenen Kovariaten  $Z_i$  abhängen, deren Einfluss auf verschiedene Weisen untersucht werden kann [130].

Die Zeit bis zur Progression wird mit Hilfe der Überlebenszeit-Funktion  $S(t)$  beschrieben, deren Verteilungsfunktion  $F(t)$  die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der ein Individuum vor dem Zeitpunkt  $t$  eine Progression erleidet.  $S(t)$  beschreibt folglich die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Individuum zum Zeitpunkt  $t$  keine Progression aufweist  $P(T_i > t)$ . Es gilt daher:

$$S(t) = P(T_i > t) = 1 - F(t) \quad \text{Gl. 3.22}$$

Die Hazard-Funktion  $h(t)$  gibt die momentane Sterberate (hier Progressionsrate) an und kann zu jedem Zeitpunkt berechnet werden. Sie steht in folgendem Zusammenhang mit der Überlebenszeit-Funktion  $S(t)$  und der Dichtefunktion  $f(t)$  sowie der ersten Ableitung der Verteilungsfunktion  $F'(t)$  (Gl. 3.23) der Progressionszeiten  $T_i$  (Gl. 3.24) [90]:

$$f(t) = F'(t) \quad \text{Gl. 3.23}$$

$$h(t) = \frac{f(t)}{S(t)} \quad \text{Gl. 3.24}$$

Der Quotient der Hazard-Funktionen zweier Populationen ist die Hazard-Ratio (HR), ein Maß für das relative Risiko, eine Progression zu erleiden im Vergleich zu einer Vergleichspopulation [94]. Die HR ist demnach äquivalent zu den Odds (engl.: Chancen) bei der logistischen Regression. Zum einfacheren Verständnis wird jedoch

oft statt der HR die Wahrscheinlichkeit  $p$  angegeben, mit der bei einem Individuum der Gruppe 1 eher ein Ereignis eintritt als bei einem der Gruppe 2. Diese steht mit der HR in folgendem Zusammenhang (Gl. 3.25) [95]:

$$HR = \frac{p}{1-p} \Leftrightarrow p = \frac{HR}{1+HR} \quad \text{Gl. 3.25}$$

Einflussfaktoren, die einen Teil der beobachteten Variabilität erklären und damit individuelle Vorhersagen erlauben, können dann im nächsten Schritt identifiziert werden. Die Kovariatenanalyse wurde mit Hilfe verschiedener Methoden durchgeführt. Potentielle Kovariaten, deren Auswahl auf einer physiologischen Rationale basierte, wurde a-priori definiert [84]. Im Hinblick auf die Untersuchung der Biomarker wurden daher Parameter gewählt, die die maximale Exposition von Sunitinib und SU12662 und die maximale Veränderung der Plasmakonzentrationen der beiden Biomarker sVEGFR-2 und sVEGFR-3 beschreiben. Korrelierten zwei Kovariaten miteinander, so wurde nur eine in das Modell eingefügt (siehe 3.8). Bei fehlender mechanistischer Grundlage für die Entscheidung wurde die Kovariate gewählt, die den größeren Effekt aufwies (siehe 3.8) [84,116].

Die Überlebenszeitanalyse kann mit einem nichtparametrischen, semi-parametrischen/normalisierten und einem parametrischen Verfahren durchgeführt werden, die jeweils in der Kaplan-Meier-Analyse, der Cox-Regression und dem modellbasierten Ansatz wiederzufinden sind. Dabei werden generell folgende Annahmen gemacht:

- Die Beobachtungen sind unabhängig voneinander und jedes Individuum ist nur einmal in die Analyse eingeschlossen.
- Zensierte Beobachtungen haben die gleiche Progressionswahrscheinlichkeit wie nicht-zensierte.

Bei der Auswertung müssen zudem der Anteil an zensierten Daten und der Datenumfang berücksichtigt werden [131].

### 3.10.1 Kaplan-Meier-Analyse

Eine Form der Darstellung der Prognose ist die mediane Überlebens- oder Progressionszeit, die die Zeit beschreibt, nach der die Hälfte der Kohorte eine Progression erlitten hat. Die mediane Zeit bis zur Progression wurde mit der Kaplan-Meier-Analyse bestimmt [94].

Die Kaplan-Meier-Analyse ist eine der verbreitetsten Analyseverfahren zur Auswertung von Überlebens- und Progressionszeiten. Bei dieser nichtparametrischen Analyseverfahren wird die kumulative Wahrscheinlichkeit keine Progression zu erleiden

unter Berücksichtigung von zensierten Daten gegen die Zeit aufgetragen. Dabei entsteht die klassische Kaplan-Meier-Kurve. Die Anzahl der Studienteilnehmer  $n_x$  verringert sich fortweilen im Verlauf der Studie, wenn die Patienten eine Progression erleiden oder zensiert werden. Zu jedem Zeitpunkt  $t_i$ , an dem eine Progression auftritt, wird die Anzahl  $d_i$  der Patienten bestimmt, die zu diesem Zeitpunkt ausscheiden, und die Anzahl  $n_i$  der Patienten, die direkt zuvor noch in der Studie sind (Risikogruppe). Die Wahrscheinlichkeit, keine Progression zu erleiden kann, somit zu jedem Zeitpunkt  $t_i$  ( $i=1, \dots, k$ ) abgeschätzt werden (Gl. 3.26).

$$S(t_i) = \frac{n_1 - d_1}{n_1} \cdot \frac{n_2 - d_2}{n_2} \cdot (\dots) \cdot \frac{n_k - d_k}{n_k} = \prod_{i=1}^k \left( \frac{n_i - d_i}{n_i} \right) \quad \text{Gl. 3.26}$$

Verlassen im Zeitraum zwischen  $t_{i-1}$  und  $t_i$  Patienten die Studie, ohne dass eine Progression festgestellt werden konnte, ist die Anzahl der in die Analyse eingehenden Patienten  $n_i$  kleiner als die Differenz aus den Patienten direkt vor dem letzten Ereignis ( $n_{i-1}$ ) und den Patienten mit Ereignis ( $d_{i-1}$ ) zum letztbetrachteten Zeitpunkt  $t_{i-1}$ . So verringert sich die Anzahl an Patienten, auf deren Grundlage die Wahrscheinlichkeit geschätzt wird. Diese zensierten Patienten werden in der Kaplan-Meier-Kurve in Form von senkrechten Strichen auf der Kurve dargestellt, um den Zeitpunkt und die Anzahl der vorzeitig ausgeschiedenen Patienten kenntlich zu machen. Ist am Ende der Beobachtungszeit bei einigen Patienten noch keine Progression festgestellt worden, kann die Funktion nur bis zum Zeitpunkt der letzten zensierten Beobachtung geschätzt werden [90,94].

Neben der Schätzung der Funktion zur Beschreibung der Zeit bis zur Progression wurde diese Methode auch für die univariate Analyse potentieller prädiktiver Kovariaten verwendet. Dazu wurde die Kohorte in Subgruppen unterteilt, die sich im Hinblick auf die betrachtete Kovariate unterschieden [90,94]. Bei dichotomen Kovariaten, wie Geschlecht und Tumortyp, wurden die Subgruppen nach Merkmalsausprägung eingeteilt. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden maximal zwei Gruppen unterschieden, sodass bei kontinuierlichen Kovariaten der Median den Grenzwert für die Gruppeneinteilung vorgab. Der ersten Gruppe wurden dabei die Patienten mit einem Messwert kleiner oder gleich dem Median der Population zugeordnet, der zweiten die mit Werten größer dem Median. Als potentielle prädiktive Faktoren wurden neben Geschlecht, Alter und Tumortyp die AUC im Steady-State der freien aktiven Substanz und einige durch das entsprechende PK/PD-Modell abgeschätzte Kenngrößen zur Beschreibung der individuellen Biomarkerantwort von sVEGFR-2 und sVEGFR-3 untersucht. Mit Hilfe des *Log-Rank-Tests* wurden die

Subgruppen auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht [90,94]. Die Kaplan-Meier-Analyse wurde mit der Funktion *survfit()* aus dem in R<sup>®</sup> (Version 2.10.1) integrierten Paket 'survival' durchgeführt [132].

### 3.10.2 Proportionales Hazard-Modell

Da mit der Kaplan-Meier-Analyse nur dichotome oder dichotomisierte Kovariaten untersucht werden können, wurden zur Analyse kontinuierlicher und zeitabhängiger Kovariaten eine Cox-Regression und eine modellbasierte Auswertung mit NONMEM<sup>®</sup> durchgeführt.

Grundlage für diese Methoden ist das 1972 von David R. Cox beschriebene Modell, in dem empirisch ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Hazard-Funktion einer Kontroll- und einer Interventionsgruppe postuliert wird, deren Überlebenskurven sich nicht schneiden (Gl. 3.27) [93]. Der Proportionalitätsfaktor  $\psi$  ist die Hazard-Ratio (HR) [90].

$$h_1(t) = \psi \cdot h_2(t) \quad \text{Gl. 3.27}$$

$$\psi = \text{HR} = e^\beta \quad \text{Gl. 3.28}$$

Da  $\psi$  nicht negativ werden kann, wird eine Exponentialfunktion (Gl. 3.28) verwendet, wobei der Parameter  $\beta$  den natürlichen Logarithmus der HR wiedergibt.  $\beta$  kann somit alle möglichen Werte annehmen. Positive Werte entsprechen dabei einer HR, die größer als 1 ist, was bedeutet, dass das Risiko für die Population 2 höher ist, eine Progression zu erleiden als für die Population 1. Es ergibt sich eine allgemein gültige Funktion, die die Hazard-Funktion für verschiedene Individuen oder Populationen abhängig von Kovariaten  $Z_i$  relativ zur Basishazard-Funktion  $h_0(t)$  unter Standardbedingungen ( $Z_i=0$ ) beschreibt (Gl. 3.29). Mehrere Kovariaten werden dabei linear miteinander verknüpft. Somit ist beim proportionalen Hazard-Modell der Logarithmus der Hazard-Ratio linear (Gl. 3.30) und unabhängig von der Basishazard-Funktion [90,93].

$$h_i(t; Z) = h_0(t) \cdot e^{\beta Z_i} \quad \text{Gl. 3.29}$$

$$\ln \psi = \beta_1 Z_{i1} + \beta_2 Z_{i2} \quad \text{Gl. 3.30}$$

Die Kovariate  $Z_i$  kann dabei ein Faktor mit verschiedenen Stufen, eine kontinuierliche oder eine von der Zeit abhängige Größe sein und erklärt einen Teil der beobachteten Variabilität der Überlebenszeit zwischen den Individuen. Die HR ist demnach das relative Risiko eines Patienten mit  $Z \neq 0$ , eine Progression zu erleiden im Vergleich zu einem Patienten unter Basisbedingungen mit  $Z=0$ . Bei kontinuierlichen Kovariaten

entspricht die HR der Veränderung des relativen Risikos, wenn sich die entsprechende Kovariate um eine Einheit erhöht (Gl. 3.31) [90].

$$\frac{e^{\beta \cdot (Z+1)}}{e^{\beta \cdot Z}} = e^{\beta} \quad \text{Gl. 3.31}$$

Sowohl für die Cox-Regression als auch für den modellbasierten Ansatz wurde zur Identifizierung der Prädiktoren ein stufenweises Ein- und Ausschlussverfahren angewendet. Dabei wurde zuerst jede Kovariate einzeln in das Modell eingeschlossen. Alle die Variablen, die zu einer statistisch signifikanten Verbesserung des Modells führten, wurden zusammen in das Modell aufgenommen. Beschrieben mehrere Kovariaten dabei den gleichen Effekt, z. B. die individuelle Reaktion von sVEGFR-3 beschrieben als AUC und  $C_{\min}$ , wurde nur diejenige mit dem stärksten Einfluss in die multivariate Analyse aufgenommen. Ausgehend von diesem Modell verblieben die Kovariaten im Modell, die nach erneutem Ausschluss zu einer signifikanten Verschlechterung des Modells führten. Anschließend wurden erneut alle übrigen Kovariaten durch Ein- und Ausschluss auf Signifikanz untersucht. Dieses Vorgehen wurde so lange wiederholt bis keine Verbesserung des Modells mehr erreicht werden konnte [90]. Abhängige Modelle wurden dabei über die Differenz des Wertes der Objektiven Funktion miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau lag dabei für den Ein- und Ausschluss einer Kovariate jeweils bei 0,1 ( $\Delta\text{OFV}$ : 2,71) und 0,05 ( $\Delta\text{OFV}$ : 3,84) [90,133]. Mit Hilfe der Cox-Regression kann nun das relative Risiko im Vergleich zu einer Kontrollgruppe bestimmt werden. Die Basishazard-Funktion lässt sich jedoch nur mit dem modellbasierten Ansatz berechnen. Bei beiden Methoden ist eine dichotome Einteilung der Kovariaten nicht nötig. Bei der parametrischen Auswertung mit Hilfe von Modellen können auch ganze Konzentrations-Zeit-Profile in das Modell integriert werden.

### *Cox-Regression*

Basierend auf den Parametern  $Y_i$ ,  $Z_i$  und  $\delta_i$  werden die Koeffizienten der Kovariaten  $\beta_i$  und die Basishazard-Funktion  $h_0(t)$  mit der Maximum-Likelihood-Methode berechnet, wobei die Schätzwerte am wahrscheinlichsten sind, die die Likelihood-Funktion maximieren. Da in der Zeit zwischen zwei Ereignissen keine Progression beobachtet wird und die Basishazard-Funktion damit den Wert 0 annimmt, stehen in diesem Intervall keine Informationen zur Berechnung der  $\beta$ -Parameter zur Verfügung. Aus diesem Grund gehen nur die Zeitpunkte ( $t_1, t_2, \dots, t_r$ ) in die Likelihood-Funktion ein, an denen eine Progression beobachtet wird. Aufgrund der geringen Fallzahl konnte jedem Progressionszeitpunkt ein Patient eindeutig zugewiesen werden. Ist diese

Voraussetzung nicht gegeben, muss die Likelihood-Funktion (Gl. 3.32) angepasst werden [90,93]. Dazu stehen Methoden von Breslow und Efron zur Verfügung [134,135]. Für jeden Zeitpunkt  $t_j$  wird nun die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der genau der betrachtete Patient von allen noch nicht progressiven eine Progression erleidet. Sie wird beschrieben durch das Verhältnis zwischen der HR desjenigen Patienten, der zu dem betrachteten Zeitpunkt progressiv ist, und der zum gleichen Zeitpunkt bestehenden Risikogruppe  $R(t_j)$ , zu der die Patienten gehören, die zu dem betrachteten Zeitpunkt  $t_j$  noch keine Progression aufweisen und unzensiert sind. Das Produkt der bedingten Wahrscheinlichkeiten zu den beobachteten Progressionszeiten stellt die Likelihood-Funktion dar (Gl. 3.32).

$$\prod_{i=1}^n \left\{ \frac{e^{\beta \cdot Z_i}}{\sum_{m \in R(t_j)} e^{\beta \cdot Z_i}} \right\}^{\delta_i} \quad \text{Gl. 3.32}$$

Dabei ist  $m$  die Anzahl der Patienten zum betrachteten Zeitpunkt ( $m \in R(t_j)$ ). Mit Hilfe des Zensierungsindikators  $\delta_i$  im Exponenten wird sichergestellt, dass nur die Zeitpunkte mit beobachteter Progression ( $\delta=1$ ) in die Berechnung eingehen [90,93].

Mittels univariater Cox-Regression wurden potentielle prädiktive Faktoren und kontinuierliche Kovariaten vorselektiert, die anschließend in eine multivariate Analyse eingeschlossen wurden [136]. Als dichotome Faktoren wurden die Tumorentität ( $Z_{\text{Rektum}}=0$ ,  $Z_{\text{Kolon}}=1$ ) und das Geschlecht ( $Z_{\text{männlich}}=0$ ,  $Z_{\text{weiblich}}=1$ ) getestet. Als kontinuierliche Kovariaten wurden demografische Daten, wie Alter, Körpergewicht und -größe, die Dosierung der Komedikation (Fluorouracil und Irinotecan) und sämtliche Parameter, die die Pharmakokinetik von Sunitinib und dessen Metabolit und die Biomarkerantwort beschreiben, untersucht. Dabei gingen sowohl gemessene Konzentrationen als auch die mit Hilfe der entsprechenden PK/PD-Modelle abgeschätzten Parameter und Konzentrationen in die Analyse ein (Appendix 7).

Der Einfluss einer eingeschlossenen Kovariate wurde neben der Differenz des Wertes der Objektiven Funktion über das 95 %-Konfidenzintervall des  $\beta$ -Parameters und das der HR beurteilt. Schloss dieses jeweils nicht 0 bzw. 1 ein, wurde davon ausgegangen, dass  $\beta \neq 0$  und  $\psi \neq 1$  gilt. Zur Berechnung des Konfidenzintervalls der HR wurden die Konfidenzgrenzen des  $\beta$ -Parameters in den Exponenten der natürlichen Exponentialfunktion gesetzt, da die wahre HR nicht  $e^\beta$  entspricht, sondern in dem Intervall zu erwarten ist, das den Ergebnissen der natürlichen Exponentialfunktion mit den Grenzen des Konfidenzintervalls des  $\beta$ -Parameters im Exponenten entspricht. Zudem ist nicht die HR selbst, sondern dessen Logarithmus und damit der  $\beta$ -

Parameter annähernd normalverteilt. Dieser steht damit für die parametrische Berechnung des Konfidenzintervalls basierend auf dem Standardfehler SE zur Verfügung (Gl. 3.33 und Gl. 3.34) [90],

$$KI_{\beta} = \beta \pm z_{1-\alpha/2} \cdot SE \quad \text{Gl. 3.33}$$

$$KI_{HR} = e^{KI_{\beta}} \quad \text{Gl. 3.34}$$

wobei  $z_{1-\alpha/2}$  das jeweilige  $1-\alpha/2$ -Quantil einer standardnormalverteilten Zufallsvariablen darstellt. Mit  $\alpha = 0,05$  ergibt sich für  $z_{1-\alpha/2}$  ein Wert von 1,96 [94]. Die Cox-Regression wurde mit der Funktion `coxph()` des in R<sup>®</sup> (Version 2.10.1) integrierten *survival*-Pakets durchgeführt [132]. Neben der Beurteilung der Relevanz eingeschlossener Kovariaten über die Konfidenzintervalle wurden abhängige Modelle auch über die Differenz des Wertes der Objektiven Funktion miteinander verglichen. Der Einschluss einer Kovariate verbesserte das Modell signifikant, wenn sich der Wert der Objektiven Funktion um mindestens 3,84 Punkte verringerte ( $\alpha = 5\%$ ) (siehe 3.5.3).

#### *PK/PD/Time-to-Event-Modell*

Für die Untersuchung der Prädiktivität verschiedener Kovariaten mit Hilfe der Software NONMEM<sup>®</sup> wurde von einer Exponentialverteilung der Progressionszeit ausgegangen. Diese stellt die einfachste Verteilung von Überlebensdaten dar und ist daher für *Time-to-Event*-Analysen bei einem kleinen Patientenkollektiv geeignet [93]. Die Funktion zur Beschreibung der Zeit bis zur Progression  $S(t)$  wird daher durch eine exponentiell fallende Kurve dargestellt (Gl. 3.35).

$$S(t) = e^{-\lambda t} \quad \text{Gl. 3.35}$$

$$h(t) = \frac{\lambda \cdot e^{-\lambda t}}{e^{-\lambda t}} = \lambda \quad \text{Gl. 3.36}$$

Die Hazard-Funktion  $h(t)$  lässt sich über den Zusammenhang zwischen Dichte- und Überlebensfunktion (siehe Gl. 3.24) ableiten und wird in diesem Fall mit einer zeitunabhängigen Sterberate/Hazardrate  $\lambda$  beschrieben (Gl. 3.36). Die Annahme, dass das Ereignis unabhängig vom Alter eintritt, ist bei schweren Erkrankungen mit kurzer Lebenserwartung gerechtfertigt [94].

Als Basismodell zur Beschreibung dieser Hazard-Funktion  $h(t)$  diene eine konstante, zeitunabhängige Basishazard-Funktion  $\lambda_0$ , in deren Abschätzungen keine individuellen Einflussfaktoren eingingen. Ausgehend von diesem Modell und der Annahme eines proportionalen Cox-Hazard-Modells (siehe Gl. 3.29) wurde der Einfluss verschiedener Kovariaten  $Z_i$  (Appendix 7) auf Signifikanz untersucht. Dabei wurde für jede Kovariate



---

der entsprechende  $\beta$ -Parameter und die Basishazard-Funktion  $\lambda_0$  abgeschätzt. Mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  galt der Einschluss einer Kovariate als statistisch signifikant, wenn sich der Wert der Objektiven Funktion verglichen mit dem Basismodell um 3,84 Punkte verringerte (siehe 3.5.3). Neben der Untersuchung von Faktoren und kontinuierlichen Kovariaten wurden auch zeitabhängige Kovariaten  $Z_i(t)$  in das Modell eingeschlossen. In diesem Fall änderte sich die Hazard-Funktion abhängig von der Kovariate über die Zeit. Zu den zeitabhängigen Kovariaten gehörten die individuelle momentane Konzentration und die AUC von Sunitinib und Metabolit sowie der beiden Biomarker. Dazu wurden die zuvor entwickelten PK/PD-Modelle mit dem Progressionszeitmodell verknüpft, sodass zu jedem Zeitpunkt die zu untersuchenden Kovariaten anhand individueller Parameter simuliert werden konnten. Neben den kontinuierlichen Kovariaten wurden somit auch zeitlich variable Einflussfaktoren als potentielle Prädiktoren analysiert (Appendix 7).

Die Güte des finalen Modells wurde mit Hilfe eines Visual Predictive Checks beurteilt (siehe 3.5.3).



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Validierung einer ELISA-Methode zur Quantifizierung von sVEGFR-3

#### 4.1.1 Selektivität und Verdünnungslinearität

Die löslichen VEGFR-3-Konzentrationen wurden in reinem und in mit rekombinantem Analyten versetztem Plasma von fünf verschiedenen Probanden bestimmt. In 169 von 187 Proben (90,4 %) lag der relative Fehler im Mittel bei  $-4,6\%$  (95 %-KI:  $-12,0 - +2,9\%$ ) und damit innerhalb der festgelegten Akzeptanzgrenzen. Bei Verwendung von Plasmamischungen lagen alle 15 Proben innerhalb der vorgegebenen Akzeptanzgrenzen mit entsprechenden mittleren Werten ( $\pm$  SD) für CV und RE von  $3,8 \pm 4,4\%$  und  $-3,2 \pm 9,7\%$ . Im Vergleich zwischen der Verdünnungsreihe aus reinem Plasma und der unter Zusatz von rekombinantem Analyten zeigte sich eine mittlere Wiederfindung von  $86,7\%$  (95 %-KI:  $82,2 - 91,3\%$ ). Die Verdünnungslinearität wurde in zwei Verdünnungsreihen mit jeweils sechs Verdünnungen zwischen 1:6 und 1:16 mit reinem und gespiktem Plasma bestimmt (Abb. 4.1).

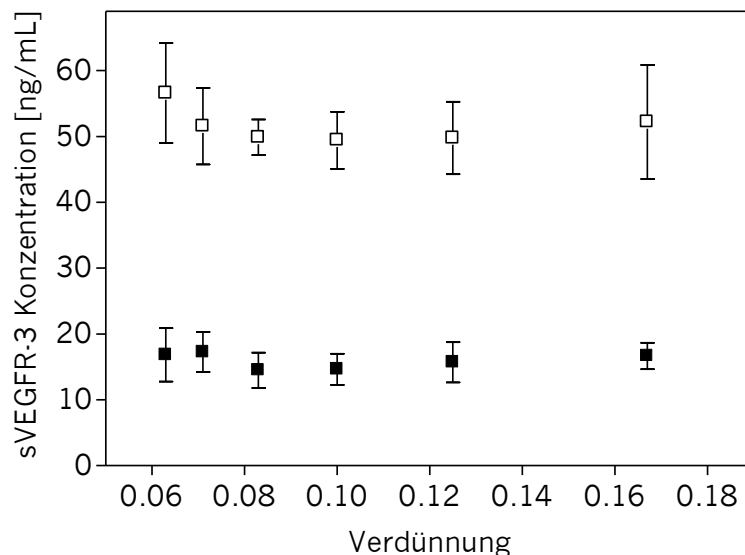


Abb. 4.1 Verdünnungslinearität von sVEGFR-3 in humanem Plasma; verdünnungsangepasste sVEGFR-3-Konzentrationen aufgetragen gegen die Verdünnung (1/Verdünnungsfaktor) für reines Plasma (■) und mit Analyt versetztem Plasma (□) (n = 6 in Doppelbestimmung, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Die mittlere Präzision und Richtigkeit der gemessenen Konzentrationen der gespikten Proben nach Subtraktion der entsprechenden Analytkonzentrationen der Proben aus reinem Plasma mit gleicher Verdünnung lagen zwischen 6,7 und 17,8 % (CV) und zwischen -17,3 und -2,1 % (RE) und damit innerhalb der Spezifizierungsgrenzen (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Verdünnungslinearität bestimmt durch die Präzision und Richtigkeit in humanem Plasma

Verdünnung	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14	1:16
Präzision (CV, %)	17,8	10,6	12,4	6,7	13,6	12,9
Richtigkeit (RE, %)						
Tag 1	-8,6	-24,8	-6,8	-9,5	-27,0	-11,9
Tag 2	-24,7	-7,8	-4,4	-17,9	+2,6	+20,1
Tag 3	-4,1	-17,0	-17,3	-9,8	-21,0	+3,5
Tag 4	-39,1	-30,2	-29,3	-13,6	-12,3	-4,0
Tag 5	-5,3	-9,4	-26,2	-24,3	-27,1	-14,6
Tag 6	+1,7	-13,6	-8,5	-11,3	-19,4	-5,8
mittlerer RE, %	-13,4	-17,1	-15,4	-14,4	-17,3	-2,1

CV: Variationskoeffizient; RE: relativer Fehler

#### 4.1.2 Auswahl der Matrix und Parallelität

Gepufferte BSA-Lösung (1 %), verdünntes oder unverdünntes und unbehandeltes oder inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) wurden als Surrogatmatrix getestet. Die Parallelität wurde in jeder Matrix bestimmt. Unverdünntes FKS, das durch 30-minütiges Erhitzen im Trockenschrank bei 50 °C inaktiviert worden war, eignete sich am besten als Surrogatmatrix, da nur in diesem Fall die Akzeptanzkriterien erfüllt waren. Zur Herstellung der Validierungsproben wurde das Plasma 1:10 mit CrossDown<sup>TM</sup>-Puffer verdünnt und anschließend mit rekombinantem Analyten versetzt, sodass die Konzentrationsstufen von 0, 416,3, 832,5, 1665,0, 3330,0, und 6660,0 pg/mL abgedeckt wurden.

Zur Untersuchung der Parallelität wurden zwei Verdünnungen (1:10 und 1:14) verwendet, die dazu geeignet waren die Konzentrationen in den Studienproben in den Kalibrierbereich hinein zu verdünnen. Das Konzentrations-Absorptionsprofil des Plasmas in beiden Verdünnungen war vergleichbar mit dem von FKS als Surrogatmatrix (Abb. 4.2 und Appendix 2b).

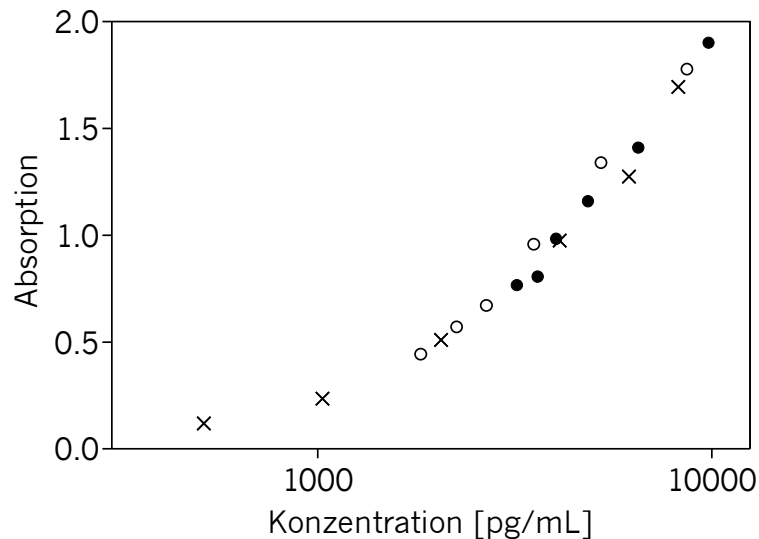


Abb. 4.2 Parallelität für unverdünntes, inaktiviertes FKS (x) und humanes Plasma in den Verdünnungen 1:10 (●) und 1:14 (○) angegeben als Absorption gegen die Konzentration. Alle Punkte zeigen Mittelwerte von zwei (FKS, Plasma 1:14) oder sechs (Plasma 1:10) Messungen. Die Abbildung zeigt die Daten eines repräsentativen Laufs aus sechs Validierungsläufen.

FKS: fetales Kälberserum

Präzision und Richtigkeit waren adäquat für alle Verdünnungen in FKS, Plasma 1:10 und Plasma 1:14 (Tab. 4.2).

Tab. 4.2 Präzision und Richtigkeit von FKS und Plasmaverdünnungen zur Bestimmung der Parallelität der sechs Validierungsläufe

Matrix	CV, % (95 %-KI)	RE, % (95 %-KI)
FKS	7,1 (4,6 - 9,5)	+0,1 (-1,4 - +1,7)
Plasma 1:10	6,3 (4,6 - 7,9)	+4,7 (+1,6 - +7,7)
Plasma 1:14	4,2 (2,6 - 5,7)	+2,3 (-1,0 - +5,6)

CV: Variationskoeffizient; RE: relativer Fehler; KI: Konfidenzintervall; FKS: fetales Kälberserum

Es bestand kein Hinweis auf eine fehlende Vergleichbarkeit der Matrizes in allen fünf untersuchten Probanden.

#### 4.1.3 Kalibrierung

Das Konzentrations-Zeit-Profil konnte am besten mit der 4-Parameter-logistischen Funktion (4-PL) beschrieben werden. Der beobachtete Zusammenhang zwischen der mittleren Absorption und der dazugehörigen Standardabweichung wies auf eine Varianzheterogenität hin (Abb. 4.3).

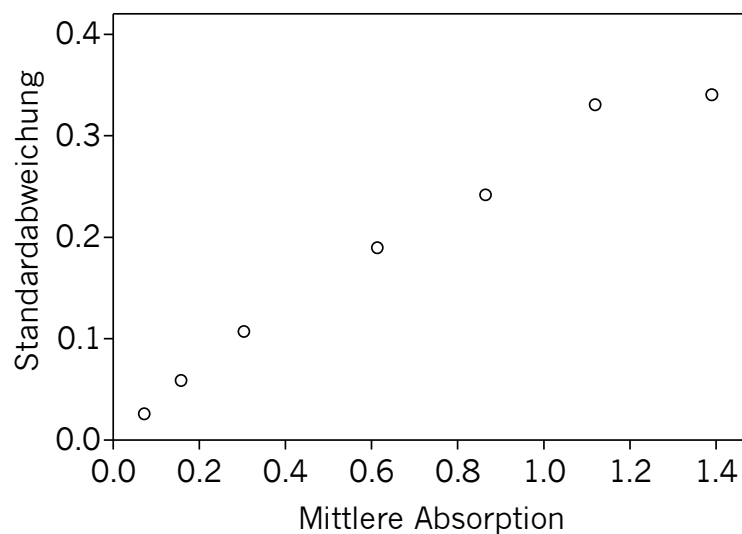


Abb. 4.3 Beziehung zwischen der mittleren Absorption und der jeweiligen Standardabweichung zur Beschreibung der Varianzheterogenität.

Um diese entsprechend zu berücksichtigen und höheren Absorptionen weniger Gewicht zu geben, wurde die Funktion mit  $1/y^2$  gewichtet [100,137]. Die Standardproben, die Pufferverdünnungen zur Generierung der Validierungsproben und die QC-Proben wurden in Form von Verdünnungsreihen mit dem Referenzstandard des Testkits hergestellt. Der Kalibrierbereich lag zwischen 513 und 10751 pg/mL mit QC-Proben geringer, mittlerer und hoher Konzentration. Bei der Betrachtung aller sechs Validierungsläufe lagen der Variationskoeffizient und der relative Fehler bei 95 und 100 % der Standardproben unterhalb von 20 %. Der mittlere Fehler und die Präzision aller Konzentrationsstufen lagen jeweils bei  $-1,9$  bis  $+3,5$  % und 2,1 bis 11,8 % und damit innerhalb der Akzeptanzkriterien von maximal 15 %.

## 4.1.4 Präzision und Richtigkeit

Frühe Abschätzungen des Variationskoeffizienten und des relativen Fehlers wurden während der Modellentwicklung mit Hilfe der Kalibratoren gemacht. Diese lagen jeweils bei 7,1 und +0,1 %. Während der *Pre-Study*-Validierung wurde die Präzision und Richtigkeit in reinem Plasma und in zwei der Validierungsproben, denen 832,5 und 1665,0 pg/mL an rekombinantem Analyt zugegeben wurde, bestimmt. Die Gesamtkonzentrationen in den gespikten Proben, zusammengesetzt aus der gespikten und der verdünnten endogenen Konzentration, variierten zwischen den Analysenläufen und wiesen mittlere finale Konzentrationen von 3238,2, 4070,7 und 4903,2 pg/mL auf. Da Unterschiede im Hinblick auf Matrixeffekte nicht auszuschließen waren, wurden weitere vier Proben von verschiedenen Probanden in Doppelbestimmung analysiert, die mittlere Variationskoeffizienten und relative Fehler von jeweils 6,6 % (95 %-KI: 2,5 - 10,8 %) und -4,6 % (95 %-KI: -12,0 - +2,9 %) hatten. *Within-day*- und *Between-day*-Präzision und -Richtigkeit sowie der gesamte Fehler lagen innerhalb der zuvor definierten Akzeptanzgrenzen (Tab. 4.3).

Tab. 4.3 *Within-day*- und *Between-day*-Präzision und -Richtigkeit und der Gesamtfehler der Validierungsproben in humanem Plasma

		zugeetzte Analytkonzentration (pg/mL)						
		0,0	832,5			1665,0		
<i>Within-day</i>	CV, %	CV, %	RE, %	Gesamtfehler, %	CV, %	RE, %	Gesamtfehler, %	
1	4,0	12,3	+13,0	25,3	5,4	+11,1	16,5	
2	6,2	6,2	+0,4	6,6	14,7	+5,3	20,0	
3	7,7	8,3	+3,7	12,0	9,7	+16,2	25,9	
4	4,2	8,6	+6,7	15,3	5,8	+3,4	9,2	
5	3,6	8,7	+0,5	9,2	5,8	-3,8	9,6	
6	3,9	1,9	+4,5	6,4	3,3	+4,9	8,2	
<i>Between-day</i>	18,3	12,0	+4,5	12,5	15,9	+6,5	14,9	

CV: Variationskoeffizient; RE: relativer Fehler

#### 4.1.5 Stabilität

Die Stabilität von sVEGFR-3 in humanem Plasma wurde bei  $-20$  und bei  $-80$  °C für einen Monat und bei  $-80$  °C für weitere 14 Monate untersucht. Die Proben waren über den beobachteten Zeitraum stabil. Der RE betrug jeweils  $+15,2$  ( $-20$  °C) und  $+4,8$  % ( $-80$  °C) innerhalb eines Monats und  $-11,5$  % ( $-80$  °C) bei Betrachtung des gesamten Zeitraums von 15 Monaten ohne einen Trend zu abnehmenden Konzentrationen. Die *Between-day*-Variabilität zwischen den Messungen der Langzeit-Stabilitätsproben bei  $-80$  °C war mit  $25,9$  % relativ hoch. Es gab keine Hinweise auf eine mangelnde Einfrier-Auftaustabilität unter den gegebenen Bedingungen (RE:  $-10,5$  bis  $+7,7$  %).

#### 4.1.6 Robustheit

Basierend auf den Akzeptanzkriterien der Kalibrierkurve, der QC- und der Validierungsproben in Plasma wurde die Robustheit der Methode unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Methode zeigte die besten Ergebnisse bei einer Inkubationstemperatur von  $30$  °C während der Bindungsreaktion zwischen Analyt und Antikörper auf der Platte. Die Methode war bei Temperaturen, die zwischen Raumtemperatur und  $37$  °C lagen, ausreichend robust, da innerhalb dieses Bereichs vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden (Tab. 4.4).

Tab. 4.4 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die mittlere Präzision und Richtigkeit in den unterschiedlichen Matrices

Temperatur	Standardproben		QC-Proben		Plasma 1:12		Plasma 1:14	
	CV, %	RE, %	CV, %	RE, %	CV, %	RE, %	CV, %	RE, %
4 °C	13,8	+2,0	0,3	+13,8	19,4	-24,2	36,6	-47,3
RT	4,9	-1,6	4,3	-2,7	5,5	-10,2	7,7	-15,9
30 °C	7,1	+0,1	5,0	-2,1	6,3 <sup>1</sup>	+4,7 <sup>1</sup>	4,2	+2,3
37 °C	6,8	-0,2	2,6	+8,8	10,4	-0,2	11,9	-4,9

RT: Raumtemperatur; <sup>1</sup>Plasma 1:10; QC: Qualitätskontrollprobe; CV: Variationskoeffizient; RE: rel. Fehler

Bei einer Inkubation im Kühlschrank ( $4$  °C) wurden hingegen ähnliche Absorptionen für alle Plasmaproben mit verschiedenen Konzentrationen an zugegebenem rekombinantem Analyten beobachtet, was zu der schlechten Präzision und Richtigkeit in der Studienmatrix führte (Abb. 4.4). Die Bindungsreaktion zwischen Antigen und Antikörper schien unter diesen Bedingungen nicht vollständig abgelaufen zu sein.



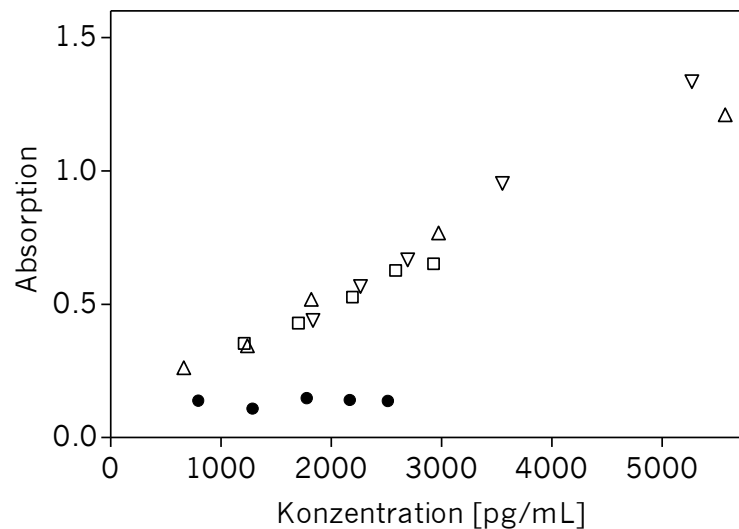


Abb. 4.4 Zusammenhang zwischen der mittleren Absorption ( $n = 2$ ) und der sVEGFR-3-Konzentration im Plasma (1:14) nach Inkubation bei 4 °C (●), Raumtemperatur (Δ), 30 °C (▽) und 37 °C (□).

Während der Bindung des Detektionsantikörpers und der Streptavidin-HRP führte die Inkubation auf einem Schüttler bei 272 rpm für 2 h bzw. 20 min zu besseren Testergebnissen (CV:  $13,0 \pm 21,2$  %; RE:  $-18,5 \pm 26,5$  % ohne Schütteln).

Bei der Verwendung verschiedener Matrices für die Kalibrierung unterschieden sich die Präzision und Richtigkeit nur geringfügig voneinander. Allerdings war die Kombination aus Anpassungsgüte der Kalibrierkurve und der Werte für CV und RE am besten für das bei 50 °C für 30 min inaktivierte FKS (Tab. 4.5).

Tab. 4.5 Mittlere ( $\pm$  SD) Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von sVEGFR-3 in Standardproben sowie Anpassungsgüte der Kalibrierkurve in verschiedenen Surrogatmatrices

Matrix	CV, %	RE, %	WSS
FKS <sup>1</sup> , unbehandelt	$13,4 \pm 14,1$	$-5,7 \pm 19,8$	0,0095
FKS <sup>2</sup> , unbehandelt	$9,2 \pm 9,1$	$+0,1 \pm 19,4$	0,1060
FKS <sup>1</sup> , inaktiviert	$10,9 \pm 15,9$	$0,0 \pm 15,3$	0,0566
1%-ige BSA-Lösung	$11,0 \pm 5,7$	$+0,4 \pm 5,2$	0,0163

<sup>1</sup>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, <sup>2</sup>PAN-Biotech, Aidenbach; CV: Variationskoeffizient; RE: relativer Fehler; WSS: Summe der gewichteten Abweichungsquadrate; FKS: fetales Kälberserum; BSA: Rinderserumalbumin

Die 1 %-ige BSA-Lösung schien dabei am ungeeignetsten zu sein, da trotz vergleichbarer Güte der Standard- und QC-Proben die Präzision und Richtigkeit im Plasma (1:10) deutlich schlechter war (Tab. 4.6).

Tab. 4.6 Mittlere ( $\pm$  SD) Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von sVEGFR-3 in Plasma (1:10) in FKS und in 1 %-iger BSA-Lösung

Matrix	CV, %	RE, %
FKS, inaktiviert	9,3 $\pm$ 6,7	+21,0 $\pm$ 9,4
1%-ige BSA-Lösung	11,6 $\pm$ 8,1	+23,3 $\pm$ 34,5

CV: Variationskoeffizient; RE: relativer Fehler; FKS: fetales Kälberserum; BSA: Rinderserumalbumin

Beim Vergleich der sVEGFR-3-Plasmakonzentrationen gleicher Proben von fünf Probanden, die anhand von Kalibrierkurven mit verschiedenen Surrogatmatrizes berechnet wurden, zeigten sich systematisch unterschiedliche absolute Werte. Dabei war der Quotient der Konzentrationen beim Vergleich der Matrizes untereinander konstant für alle untersuchten Probanden (interindividuell) (Tab. 4.7).

Tab. 4.7 Verhältnis der berechneten absoluten Plasmakonzentrationen von sVEGFR-3 unter Verwendung verschiedener Surrogatmatrizes bei fünf Probanden

Kombination	Faktor (MW $\pm$ SD)
FKS <sub>ubh</sub> <sup>1</sup> / FKS <sub>ubh</sub> <sup>2</sup>	0,80 $\pm$ 0,05
FKS <sub>ubh</sub> <sup>1</sup> / FKS <sub>inakt</sub> <sup>1</sup>	0,73 $\pm$ 0,01
FKS <sub>ubh</sub> <sup>2</sup> / FKS <sub>inakt</sub> <sup>1</sup>	0,92 $\pm$ 0,07

<sup>1</sup>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; <sup>2</sup>PAN-Biotech GmbH, Aidenbach; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; FKS: fetales Kälberserum; ubh: unbehandelt; inakt: inaktiviert

Das Konzentrations-Zeit-Profil eines Probanden, berechnet anhand von Kalibrierkurven mit zwei verschiedenen Surrogatmatrizes (FKS, inaktiviert vs. 1 %-BSA-Lösung), zeigte ebenfalls einen proportionalen Zusammenhang der berechneten Konzentrationen (intraindividuell) (0,70  $\pm$  0,01, n = 37). Die Wahl der Surrogatmatrix war demnach kritisch insbesondere im Hinblick auf absolute Konzentrationen, schien aber auf die relativen Werte aufgrund der Proportionalität weniger Einfluss zu haben.

#### 4.1.7 Anwendbarkeit in der klinischen Praxis

Während der Quantifizierung der Proben der zwölf Probanden lag in zwei Analysenläufen je eine QC-Probe außerhalb der Akzeptanzkriterien mit einer Präzision (CV) von 26,4 % (niedrigste Konzentration) im ersten und einer Richtigkeit (RE) von -39,4 % (höchste Konzentration) im zweiten Analysenlauf. Alle anderen QC-Proben lagen innerhalb der Akzeptanzkriterien (Tab. 4.8).

Tab. 4.8 Mittlere Präzision (CV) und Richtigkeit (RE) der Qualitätskontrollproben zur Bestimmung von sVEGFR-3

Konzentrationen [pg/mL]	CV $\pm$ SD, %	RE $\pm$ SD, %
1027,8	5,0 $\pm$ 4,4	+3,5 $\pm$ 5,5
4111,1	7,4 $\pm$ 9,4	-4,7 $\pm$ 13,0
8222,2	6,0 $\pm$ 7,0	-10,9 $\pm$ 19,4

Alle Proben der in die Studie eingeschlossenen Probanden konnten vermessen werden. Die mediane Basiskonzentration aller Probanden lag bei 20 337 pg/mL (Interquartilsabstand (IQR)): 16 952 - 22 532 pg/mL). Nach Beginn der Einnahme von Sunitinib nahmen die Konzentrationen ab und stiegen nach Beendigung der Applikation wieder an, erreichten jedoch innerhalb des betrachteten Zeitraums nicht wieder die entsprechende Basiskonzentration. Für die Probanden der Hauptphase, die an fünf aufeinander folgenden Tagen 50 mg Sunitinib bekommen hatten, wurde an Tag 6 eine maximale mediane Veränderung auf 57 % (IQR: 50 - 88 %, Mittelwert  $\pm$  SD: 68  $\pm$  24 %) des jeweiligen Basiswertes beobachtet (Abb. 4.5).

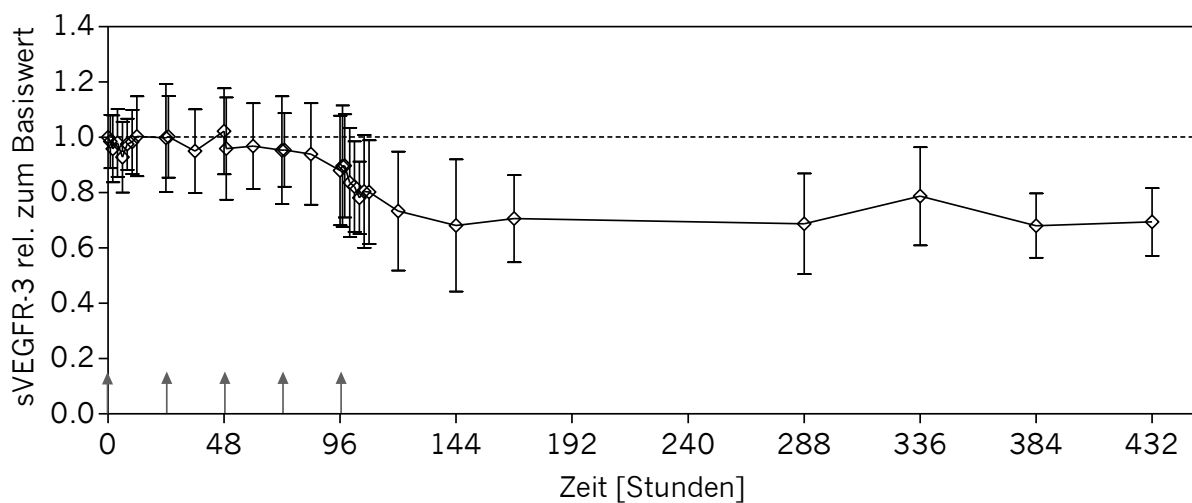


Abb. 4.5 sVEGFR-3-Konzentrations-Zeit-Profil relativ zum Basiswert für acht Probanden der Hauptphase nach fünftägiger Sunitinibgabe ( $\uparrow$ ) angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

## 4.2 Konzentrations-Zeit-Verläufe der Biomarker

### 4.2.1 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A

#### *Qualitätskontrolle*

Bei der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Herstellerangaben lagen Präzision und Richtigkeit für humanes Plasma für verschiedene Konzentrationen jeweils bei 1,5 bis 6,4 % bzw. +0,5 bis +15,3 %. Für jede Konzentrationsstufe der QC-Proben wurde der Referenzwert über den Mittelwert der ersten drei Analysenläufe bestimmt. Präzision und Richtigkeit lagen bei allen QC-Proben und Läufen innerhalb der zuvor festgelegten Akzeptanzkriterien (Tab. 4.9).

Tab. 4.9 Präzision und Richtigkeit der Qualitätskontrollproben für VEGF-A

Referenzbereich <sup>1</sup> [pg/mL]	Referenzwert [pg/mL]	CV ± SD, %	RE ± SD, %
42 - 119	82,5	4,3 ± 3,5	+4,3 ± 5,1
1123 - 2317	1820,3	2,9 ± 1,1	+4,3 ± 5,1
8687 - 14 443	12 118,8	5,8 ± 6,3	+4,3 ± 4,8

<sup>1</sup>nach Herstellerangaben; CV: Variationskoeffizient; RE: relativer Fehler; SD: Standardabweichung

#### *Konzentrations-Zeit-Profil*

VEGF-A konnte in allen Proben quantifiziert werden. Die Basiswerte zeigten eine hohe Variabilität innerhalb der Population mit einer medianen Plasmakonzentration von 156,3 pg/mL (IQR: 60,1 - 239,6 pg/mL). Nach Beginn der Sunitinibtherapie zeigte sich bei Betrachtung aller Daten im Median nur eine geringe Veränderung der VEGF-A-Plasmakonzentrationen relativ zum Basiswert, die bei Beendigung der Sunitinibeinnahme das Maximum erreichte (Abb. 4.6 A). Am Tag 28 war die VEGF-A-Plasmakonzentration im Median (IQR) um das 1,3 (0,7 - 2,1)-fache angestiegen (Mittelwert ± SD: 2,3 ± 2,5). Betrachtet man die Studienzentren getrennt voneinander, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen dem medianen Konzentrations-Zeit-Profil des Zentrums 1 verglichen mit denen der anderen Studienzentren. Dabei stiegen die Konzentrationen bei den Patienten des Zentrums 1 im Median (IQR) um das 6,2 (4,9 - 6,9)-fache an (Mittelwert ± SD: 5,5 ± 2,6), während bei den Patienten der anderen Zentren kaum eine Veränderung zu erkennen war. Damit wurde die beobachtete Reaktion der Biomarkerkonzentrationen in der betrachteten Population vor allem durch die Patienten aus Zentrum 1 hervorgerufen (Abb. 4.6 B).

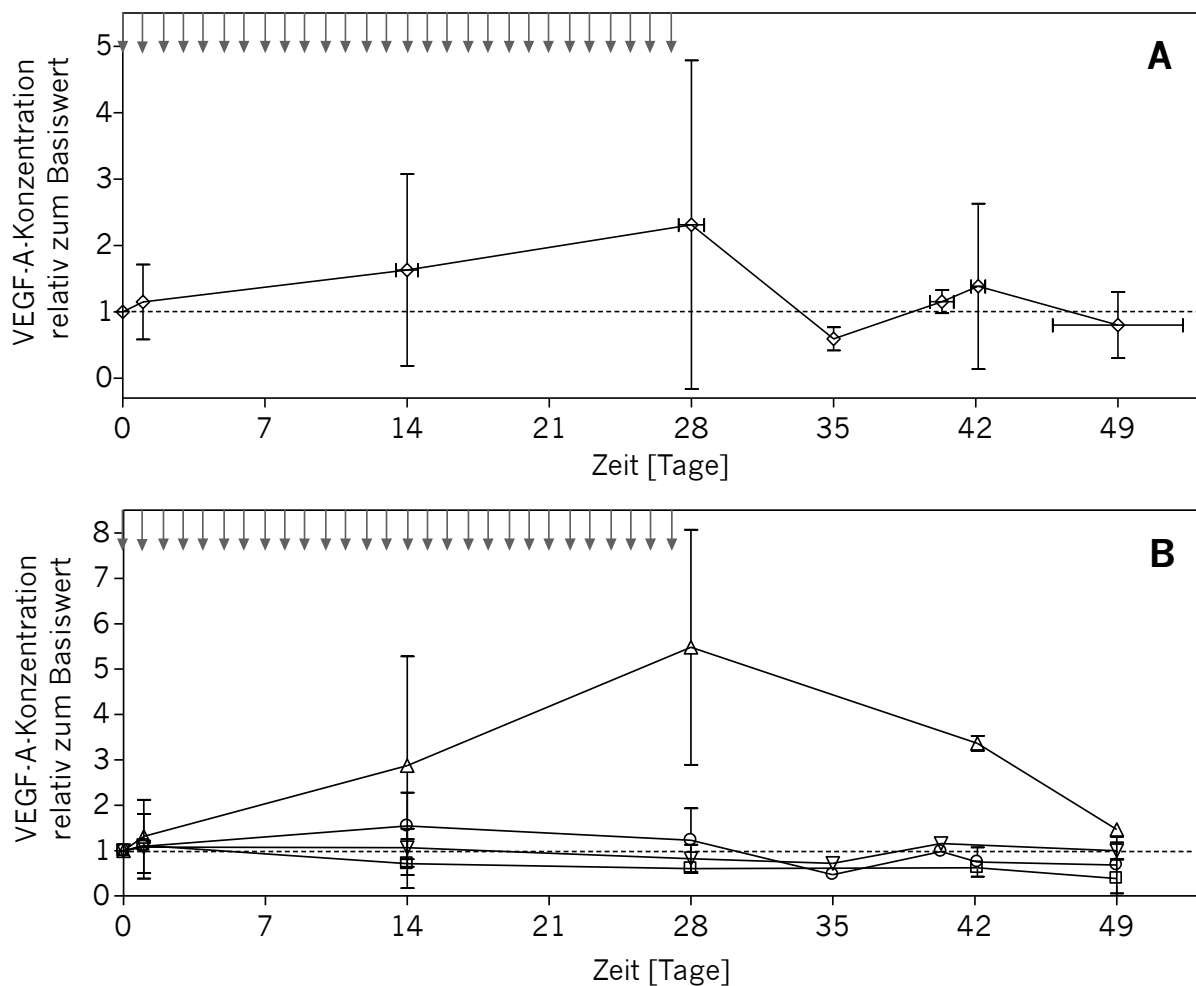


Abb. 4.6 VEGF-A-Konzentrations-Zeit-Profile relativ zum Basiswert **A** VEGF-A-Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten von 21 Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom nach vierwöchiger Sunitinibgabe (↓) von 37,5 mg/Tag und anschließender Therapiepause und **B** aufgetrennt nach den Studienzentren 1 (Δ, n = 5), 2 (∇, n = 6), 3 (□, n = 3) und 4 (○, n = 7); die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung.

Da es in den Zentren 2, 3 und 4 sowohl Patienten gab, deren Biomarkerkonzentrationen nach Therapiebeginn anstiegen, als auch solche, bei denen abnehmende Konzentrationen beobachtet wurden, konnte generell keine vom Basiswert eindeutig zu unterscheidende Veränderung der VEGF-A-Konzentrationen festgestellt werden, sodass eine weitere PK/PD-Auswertung als nicht sinnvoll erschien.

#### *Einfluss der Zentrifugation*

Bei der Untersuchung des Einflusses der Zentrifugation auf die absoluten VEGF-A-Konzentrationen zeigte sich, dass die verwendete Zentrifuge insbesondere bei niedrigen Zentrifugalbeschleunigungen eine Rolle zu spielen schien. Zwei verschiedene

Zentrifugen ((1) und (2)) wurden verwendet, um den Einfluss des Zentrifugentyps zu untersuchen. Dabei waren die gemessenen Konzentrationen bei Verwendung der Zentrifuge (2) systematisch niedriger. Bei 1000 g lagen die VEGF-A-Konzentrationen unter Verwendung der Zentrifuge (1) und (2) bei jeweils 36,3 bzw. 45,8 pg/mL. Der Unterschied zwischen den beiden Zentrifugen nahm jedoch bei etwa 2000 g ab und fiel anschließend nicht weiter ins Gewicht (Abb. 4.7 A). Mit zunehmender relativer Zentrifugalbeschleunigung wurden niedrigere VEGF-A-Konzentrationen im entsprechenden Plasma beider Probanden beobachtet (Abb. 4.7 B).

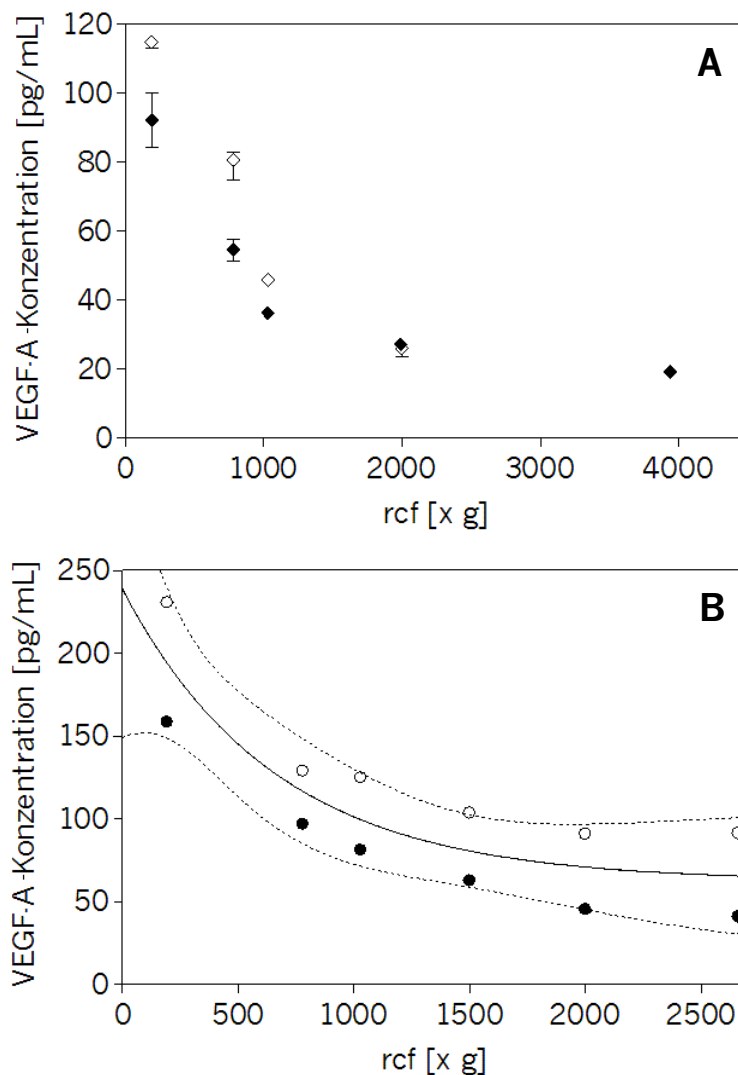


Abb. 4.7 Einfluss der Zentrifugalbeschleunigung (rcf) auf die VEGF-A-Plasmakonzentrationen **A** unter Verwendung verschiedener Zentrifugen mit Zentrifuge (1) (◆, n = 3) und Zentrifuge (2) (◇, n = 3) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und **B** im Vergleich zweier Probanden mit Proband 1 (●) und Proband 2 (○); exponentielle Regressionskurve (—) und 95 %-Konfidenzintervall (---).

Auch in diesem Experiment war zu erkennen, dass ab etwa 2000 g keine Veränderungen der VEGF-A-Konzentration im Plasma aufgetreten waren. Daher schien eine Zentrifugalbeschleunigung von mindestens 2000 g nötig zu sein, um Effekte, die sowohl durch verschiedene Zentrifugen als auch durch Schwankungen in der Einstellung hervorgerufen wurden, zu vermeiden.

Bei der detaillierteren Betrachtung der beiden ausgewählten Zentrifugalbeschleunigungen wurde der Zusammenhang bestätigt. Hier zeigte sich, dass die mediane Plasmakonzentration (IQR) von VEGF-A der acht Probanden bei 780 g mit 112,7 pg/mL (76,2 - 134,7 pg/mL) statistisch signifikant höher ist als die bei 1030 g mit 91,6 pg/mL (56,0 - 109,7 pg/mL) ( $p = 0,0017$ , gepaarter t-Test).

#### 4.2.2 Löslicher VEGF-Rezeptor 2

##### *Qualitätskontrolle*

Zur Überprüfung der Herstellerangaben zur Präzision und Richtigkeit wurden Plasmaproben eines Freiwilligen mit berechneten Konzentrationen von 7787,6, 8109,1, 9216,2 und 11 001,9 pg/mL in Sechsfachbestimmung vermessen. Die angegebene Präzision konnte für alle Proben reproduziert werden und lag zwischen 2,2 und 4,3 %. Verglichen mit den Angaben in Zellüberstand konnte die Richtigkeit nur für die ersten beiden Konzentrationen reproduziert werden und lag bei +14,3 und +6,2 %. Da eine andere Charge an QC-Proben verwendet wurde als bei vorherigen Messungen, konnten die Referenzkonzentrationen zur Berechnung der Richtigkeit, definiert als der Mittelwert jeder Konzentrationsstufe innerhalb der ersten drei Analysenläufe, nicht verwendet werden. Der mittlere relative Fehler läge in diesem Fall bei Null und die Standardabweichung würde damit die Präzision und nicht die Streuung des RE wiedergeben.

Die Präzision war für alle QC-Proben der Analysenläufe während der Bestimmung der Studienproben innerhalb der festgelegten Akzeptanzkriterien von < 20 % (Tab. 4.10).

Tab. 4.10 Mittlere ( $\pm$  SD) Präzision der Qualitätskontrollproben von sVEGFR-2

Referenzbereich [pg/mL]	Interne Referenz [pg/mL]	CV $\pm$ SD, %
216 - 370	260,0	1,3 $\pm$ 0,6
1171 - 1920	1486,1	2,1 $\pm$ 1,2
2340 - 3413	2710,6	1,6 $\pm$ 0,4

CV: Variationskoeffizient; SD: Standardabweichung

### Konzentrations-Zeit-Profil

Der lösliche VEGFR-2 konnte in allen Proben quantifiziert werden. Die Basiskonzentration lag im Median bei 9362 pg/mL (IQR: 7898 - 9941 pg/mL). Nach Therapiebeginn sank die Konzentration und erreichte das Minimum nach 28 Tagen mit einer maximalen medianen Reduktion auf 61 % (IQR: 57 - 72 %) (Mittelwert  $\pm$  SD:  $65 \pm 13$  %) bezogen auf die jeweilige Basiskonzentration. Innerhalb der Therapiepause stiegen die Werte wieder an, erreichten jedoch nicht vollkommen die Konzentrationen, die zu Beginn der Therapie beobachtet wurden (Abb. 4.8 A). Bei separater Betrachtung der Studienzentren war kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Konzentrations-Zeit-Profilen zu erkennen (Abb. 4.8 B).

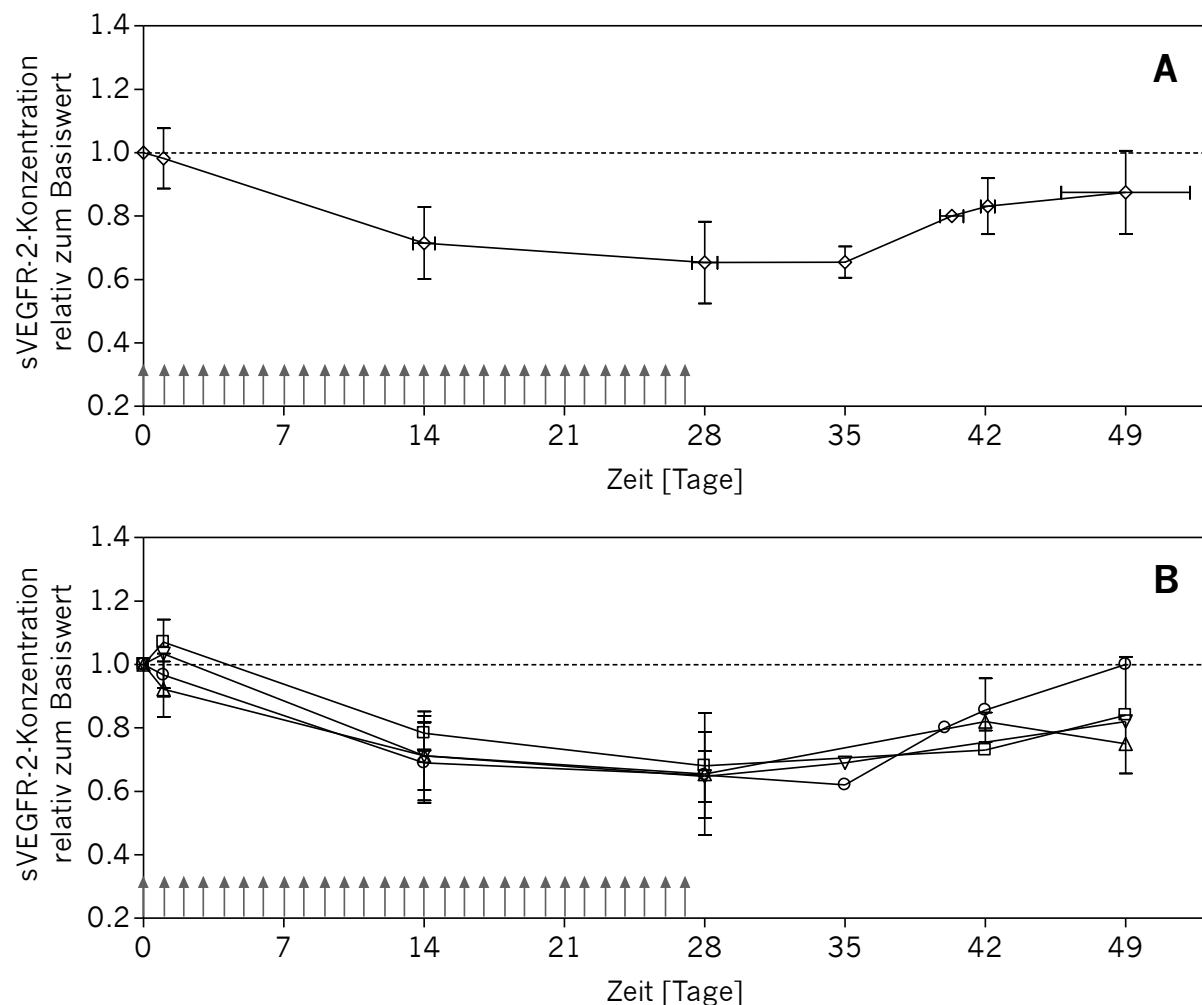


Abb. 4.8 sVEGFR-2-Konzentrations-Zeit-Profile relativ zum Basiswert **A** sVEGFR-2-Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten von 21 Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom nach vierwöchiger Sunitinibgabe ( $\uparrow$ ) von 37,5 mg/Tag und anschließender Therapiepause und **B** aufgetrennt nach den Studienzentren 1 ( $\Delta$ , n = 5), 2 ( $\nabla$ , n = 6), 3 ( $\square$ , n = 3) und 4 ( $\circ$ , n = 7); die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.



*Einfluss der Zentrifugation*

Die relative Zentrifugalbeschleunigung (rcf) schien auf die beobachteten Plasmakonzentrationen von sVEGFR-2 keinen erheblichen Einfluss zu haben (Abb. 4.9).

Auch die mittleren Konzentrationen bei Beschleunigungen von 780 und 1030 g wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf ( $p = 0,9698$ , gepaarter t-Test). Da kein Einfluss der Zentrifugalbeschleunigung auf die Plasmakonzentrationen von sVEGFR-2 identifiziert werden konnte, wurden keine weiteren Versuche zum Einfluss der Zentrifuge auf die Quantifizierung von sVEGFR-2 durchgeführt.

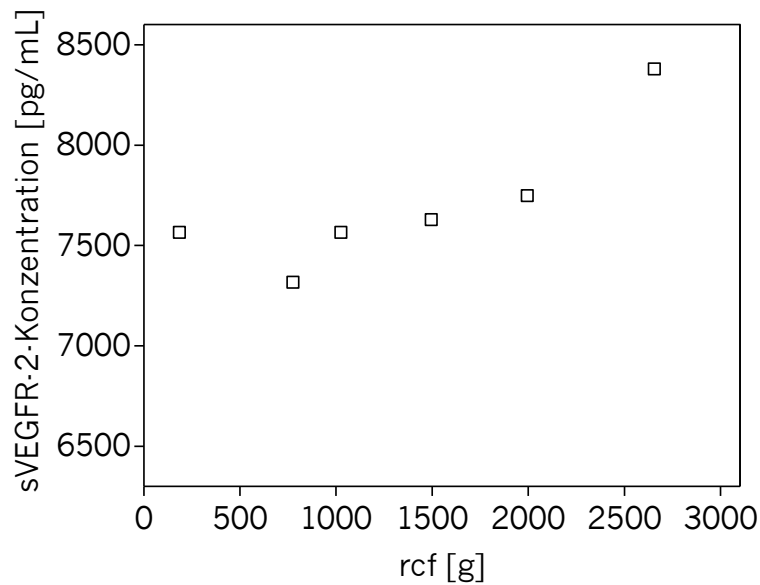


Abb. 4.9 Einfluss der relativen Zentrifugalbeschleunigung (rcf) auf die sVEGFR-2-Plasmakonzentrationen eines Probanden.

### 4.2.3 Löslicher VEGF-Rezeptor 3

#### *Qualitätskontrolle*

An einem Analysentag lag die Richtigkeit der höchsten QC-Probe bei der Bestimmung der Patientenproben bei –25,0 %, für alle anderen QC-Proben und Analysentage waren die zuvor festgelegten Kriterien erfüllt (Tab. 4.11).

Tab. 4.11 Mittlere ( $\pm$  SD) Präzision und Richtigkeit der Qualitätskontrollproben für sVEGFR-3

Konzentrationen [pg/mL]	CV $\pm$ SD, %	RE $\pm$ SD, %
1027,8	3,2 $\pm$ 4,1	–5,1 $\pm$ 5,5
4111,1	3,5 $\pm$ 1,8	–2,2 $\pm$ 3,6
8222,2	13,0 $\pm$ 10,2	–8,9 $\pm$ 15,4

CV: Variationskoeffizient; RE: relativer Fehler; SD: Standardabweichung

#### *Konzentrations-Zeit-Profil*

Der lösliche VEGFR-3 konnte in allen Proben quantifiziert werden. Die Plasmakonzentration nach 49 Tagen des Patienten mit der Identitätsnummer (ID) 02-02 wurde aus der weiteren Analyse ausgeschlossen, da das Ergebnis der Messung kinetisch nicht plausibel war (zweimal bzw. dreimal so hoch wie an den Tagen 41 bzw. 63). Die mediane Basiskonzentration aller Patienten lag bei 17 501 pg/mL (IQR: 14 617 – 30 632 pg/mL) und war vergleichbar mit der der Probanden ( $p = 0,2291$ , t-Test) (siehe 4.1.7). Die Variabilität der Basiskonzentrationen unter den Patienten war dagegen deutlich höher als die der Probanden. Auch für die Patienten wurde ein Abfall der Konzentrationen nach Therapiebeginn beobachtet, die jedoch verglichen mit den Probanden nach Beendigung der Applikation die Ausgangswerte annähernd wieder erreichten. Die Plasmakonzentrationen fielen im Median auf 58 % (IQR: 47 - 80 %) (Mittelwert  $\pm$  SD: 63  $\pm$  19 %) des entsprechenden Basiswertes nach vierwöchiger Sunitinibtherapie mit einer Dosis von 37,5 mg/Tag ab (Abb. 4.10 A). Bei getrennter Betrachtung der Studienzentren war kein Unterschied der mittleren Konzentrations-Zeit-Verläufe zu erkennen, wobei die hohe Variabilität zwischen den Zentren die hohe beobachtete Gesamtvariabilität widerspiegelte (Abb. 4.10 B).

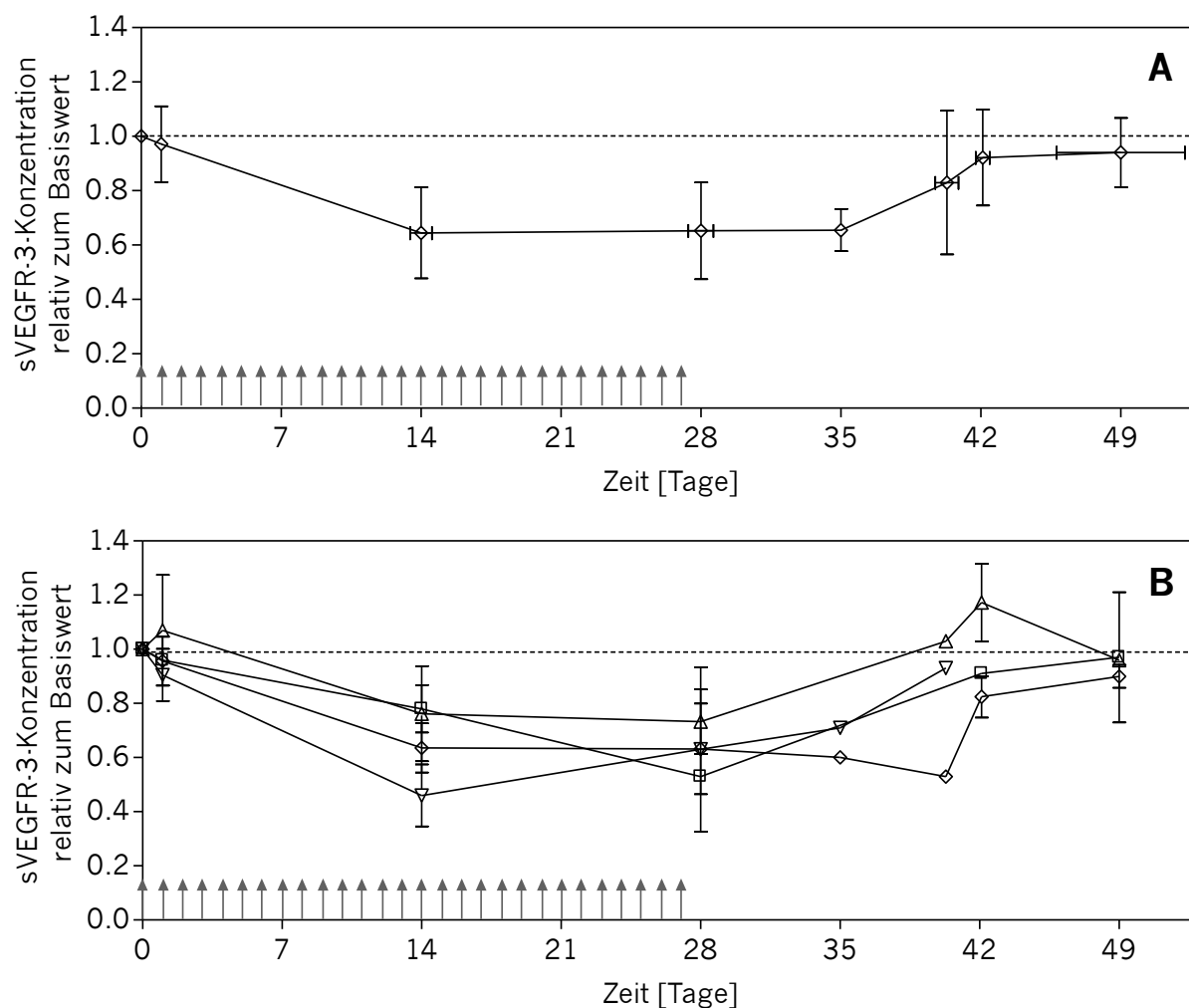


Abb. 4.10 sVEGFR-3-Konzentrations-Zeit-Profile relativ zum Basiswert. **A** sVEGFR-3-Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten von 21 Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom nach vierwöchiger Sunitinibgabe (↑) von 37,5 mg/Tag und anschließender Therapiepause und **B** aufgetrennt nach den Studienzentren 1 ( $\Delta$ ,  $n = 5$ ), 2 ( $\nabla$ ,  $n = 6$ ), 3 ( $\square$ ,  $n = 3$ ) und 4 ( $\circ$ ,  $n = 7$ ). Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

#### *Einfluss der Zentrifugation*

Bei der Untersuchung eines potentiellen Einflusses der relativen Zentrifugalbeschleunigung konnten keine systematischen Unterschiede der sVEGFR-3-Plasmakonzentrationen bei zunehmender Beschleunigung festgestellt werden. Allerdings lagen die Konzentrationen bei 1500 g beider untersuchter Probanden deutlich niedriger als die jeweils anderen, wobei der Effekt beim Probanden mit höheren Konzentrationen deutlich stärker war (Abb. 4.11).

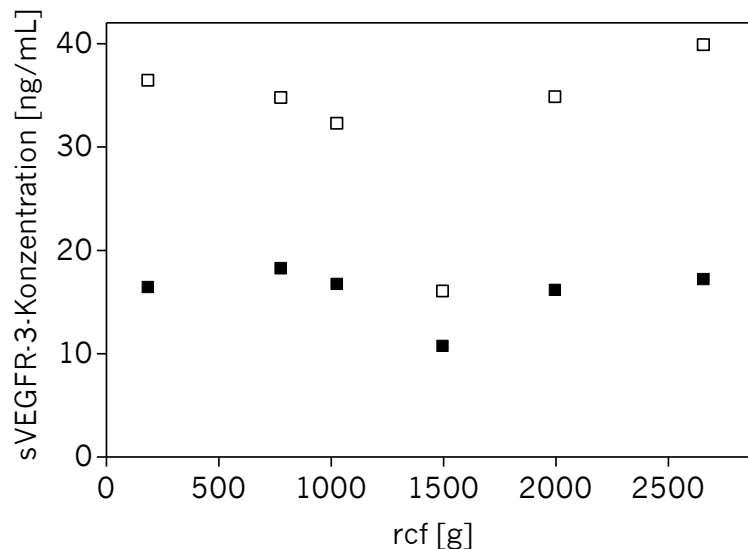


Abb. 4.11 Einfluss der relativen Zentrifugalbeschleunigung (rcf) auf die sVEGFR-3-Plasmakonzentrationen bei zwei Probanden. Daten sind gegeben als Mittelwert für jeden Probanden.

Auch bei der Betrachtung der beiden ausgewählten Zentrifugalbeschleunigungen wurde weder zwischen den Proben der zwei Phasen innerhalb der Probandenstudie ( $p = 0,1687$ , t-Test) noch beim Vergleich der Proben fünf weiterer Probanden, die bei 780 und bei 1030 g zentrifugiert worden waren ( $p = 0,0552$ , gepaarter t-Test), ein signifikanter Unterschied beobachtet.

### 4.3 Pharmakokinetisches Modell

#### *Modellentwicklung und -evaluierung*

Die Entwicklung des Strukturmodells basierte auf dem zuvor für Probanden entwickelten Modell [97]. Die zusätzliche Einbeziehung eines weiteren Kompartiments für den Metaboliten reduzierte den Wert der Objektiven Funktion um 111,117 Einheiten und verbesserte das Modell signifikant ( $p < 0,001$ ). Interindividuelle Variabilität (IIV) konnte für die Clearance von Sunitinib ( $\Delta\text{OFV}: -12,090$ ,  $p < 0,001$ ) und SU12662 ( $\Delta\text{OFV}: -6,968$ ,  $p < 0,01$ ) und für die Anzahl der Transitkompartimente ( $\Delta\text{OFV}: -7,987$ ,  $p < 0,01$ ) abgeschätzt werden. Der Residualfehler der Plasmakonzentrationen beider Substanzen wurde jeweils am besten mit einem proportionalen Fehlermodell beschrieben (Appendix 3). Das Volumen des peripheren Kompartiments von Sunitinib konnte nur relativ schwierig abgeschätzt werden und wurde daher auf den initial abgeschätzten Populationsmittelwert fixiert. Die Präzision

der anderen Parameter, gegeben durch das 90 %-Bootstrap-Konfidenzintervall, war jedoch hinreichend gut (Tab. 4.12).

Tab. 4.12 Abschätzungen der Modellparameter und das 90 %-Bootstrap-Konfidenzintervall für das pharmakokinetische Modell

Parameter	Wert	90%-KI (Bootstrap)
<i>Strukturmodell</i>		
KA [h <sup>-1</sup> ]	0,54	fixiert <sup>1</sup>
N	1,46	fixiert <sup>1</sup>
MTT [h]	1,48	fixiert <sup>1</sup>
RPS	1,91	fixiert <sup>1</sup>
FM	0,21	fixiert <sup>1</sup>
CL/F <sub>Su</sub> [L/h]	38,1	32,9 - 44,3
V1/F <sub>Su</sub> [L]	3090	2708 - 3604
Q/F <sub>Su</sub> [L/h]	0,47	0,39 - 2,21
V2/F <sub>Su</sub> [L]	643	fixiert
CL <sub>Met</sub> [L/h]	20,6	17,5 - 24,8
V1 <sub>Met</sub> [L]	1680	1221 - 2423
Q <sub>Met</sub> [L/h]	2,39	1,35 - 3,89
V2 <sub>Met</sub> [L]	684	653 - 905
<i>Statistisches Modell</i>		
η <sub>CLS<sub>u</sub></sub>	0,20	0,14 - 0,25
η <sub>CL<sub>Met</sub></sub>	0,15	0,09 - 0,20
η <sub>N</sub>	1,63	0,91 - 2,39
<i>Restfehler</i>		
CV <sub>Su</sub>	25,9 %	19,7 - 30,9 %
CV <sub>Met</sub>	28,6 %	24,1 - 31,7 %

<sup>1</sup>Werte stammen aus vorheriger Abschätzung [97]; Su: Sunitinib; Met: SU12662; KA: Absorptionsgeschwindigkeitskonstante; N: Anzahl der Transitkompartimente; MTT: mittlere Transitzeit; RPS: Verhältnis prä- zu systemischer Metabolisierung; FM: metabolisierte Fraktion; CL: Clearance; F: Bioverfügbarkeit; V: Verteilungsvolumen; Q: interkompartimentelle Clearance; η: interindividuelle Variabilität; CV: Variationskoeffizient; KI: Konfidenzintervall

Modellfehlspezifikationen des PK-Modells waren wenig wahrscheinlich, da die Shrinkage-Effekte für η<sub>CLS<sub>u</sub></sub> und η<sub>CL<sub>Met</sub></sub> mit 4,4 und 16,3 % unterhalb und für η<sub>N</sub> mit

22,3 % nur knapp oberhalb des akzeptierten Grenzwertes von 20 % lagen. Gleiches galt auch für die Epsilon-Shrinkage, die mit 10,1 % als akzeptabel angesehen wurde. Zudem unterschieden sich die Mittelwerte der Abschätzungen der interindividuellen Variabilität nicht signifikant von Null ( $p > 0,05$ ), sodass es keinen Hinweis auf fehlende Normalverteilung der  $\eta$  gab. Der mediane Verlauf der Konzentrationen beider aktiver Substanzen und die Variabilität der SU12662-Konzentrationen zwischen den Patienten wurden durch das Modell gut wiedergegeben (Abb. 4.12 A und B).

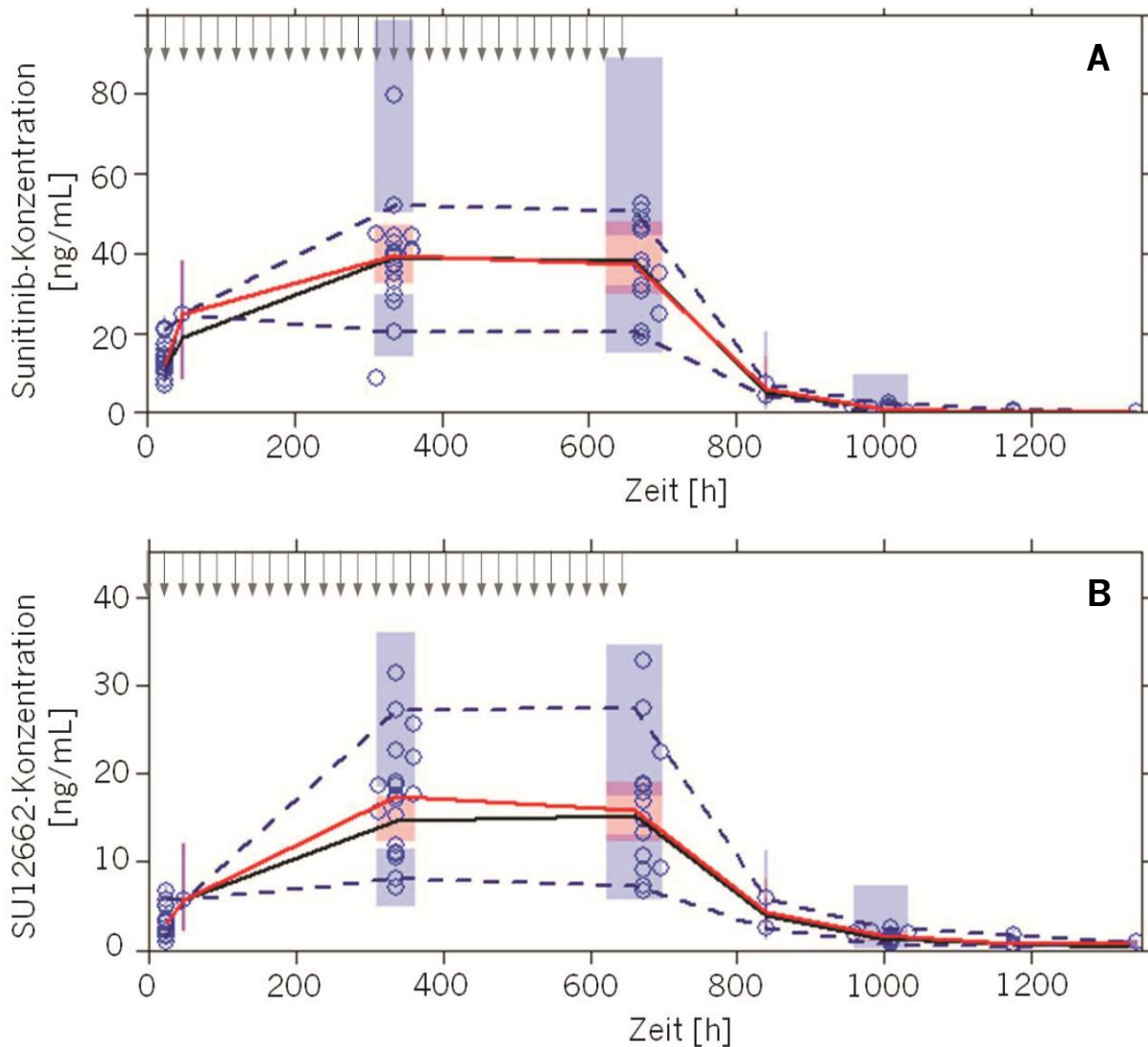


Abb. 4.12 Visual Predictive Check für die Plasmakonzentrationen ( $\circ$ ) von **A** Sunitinib und **B** SU12662 zusammen mit dem Median ( $-$ ) und dem 5 und 95 %-Perzentil der Beobachtungen ( $- - -$ ) sowie mit dem Median ( $-$ ) und dem 95 %-Konfidenzintervall der 5 und 95 %-Perzentile ( $\blacksquare$ ) und des Medians ( $\blacksquare$ ) von 1000 Simulationen für eine vierwöchige Therapie mit 37,5 mg/Tag Sunitinib und anschließender Therapiepause.

Die Variabilität der Sunitinibkonzentrationen war zwei Wochen nach Therapiebeginn relativ hoch und wurde auch vom Modell durch ein großes Vorhersageintervall wiedergegeben. Zu früheren und späteren Zeitpunkten war diese weniger deutlich ausgeprägt, wurde jedoch vom Modell weiterhin relativ hoch abgeschätzt (Abb. 4.12 A).

#### *Einfluss der fixierten Modellparameter*

Bei systematischer Veränderung der fixierten Modellparameter waren Unterschiede in der Parameterabschätzung zu beobachten. Bei Variation der Absorptionskonstante  $K_A$  war ein Einfluss auf  $Q/F$  zu beobachten, der mit  $-1,1$  bis  $+4,1$  % jedoch relativ gering ausfiel. Im Hinblick auf  $N$  war die stärkste Veränderung von  $-18,6$  bis  $+12,3$  % in der interindividuellen Variabilität dieses Parameters zu finden. Bei jeweils 50 % des ursprünglichen Wertes der MTT und des RPS wurde das Modell signifikant verbessert ( $p < 0,05$ ), wobei  $Q_{Su}$  ( $-10$  ·  $+6,7$  %) bzw.  $V_{1Met}$  ( $-24,4$  ·  $+14,3$  %) und  $Q_{Met}$  ( $-14,6$  ·  $+20,9$  %) am stärksten beeinflusst wurden. Bei  $V_{2Su}$  wirkten sich Veränderungen der im Modell fixierten Werte am stärksten auf  $Q/F$  mit  $-9,9$  bis  $+13,7$  % aus.

#### *Einfluss des Einnahmezeitpunktes von Sunitinib*

Mit Hilfe der Sensitivitätsanalyse sollte auch untersucht werden, wie stark sich der Dosierungszeitpunkt auf die Abschätzung der Modellparameter auswirkt. Systematische Unterschiede in der Parameterabschätzung waren durch die zufällige Wahl der Einnahmezeit von Sunitinib zwischen 7 und 10 Uhr morgens verglichen zu der bei angenommener einheitlicher Applikation um 8 Uhr morgens zu erkennen. Dabei wiesen die Strukturparameter bis auf  $V_{2Met}$  und  $Q_{Met}$  (beide positiv) einen negativen und die interindividuelle Variabilität und Restvariabilität einen positiven Bias auf. Die neu abgeschätzten Modellparameter bei veränderter Dosierungszeit lagen allerdings alle innerhalb des entsprechenden durch das Bootstrap-Verfahren berechneten 90 %-Konfidenzintervalls der Referenzparameter (Tab. 4.12).

Die Parameterabschätzungen zwischen den Modellläufen mit zufälligen Einnahmezeitpunkten lagen alle eng beieinander und wiesen damit eine hohe Präzision auf. Diese war höher als die im Vergleich zu dem Modell mit auf einen Zeitpunkt fixierten Dosierungen (hier: 8 Uhr morgens). Der Einfluss des Einnahmezeitpunktes schien daher geringer zu sein, wenn dieser zufällig innerhalb eines bestimmten Zeitfensters gewählt wurde als bei der Annahme einer einheitlichen Einnahme für alle Patienten (beispielsweise um 8 Uhr morgens). Am stärksten betroffen von der Wahl des Einnahmezeitpunktes war das periphere

Verteilungsvolumen der Muttersubstanz, das generell schlecht abschätzbar war und daher im finalen Modell fixiert wurde (Tab. 4.13).

Tab. 4.13 Einfluss des Dosierungszeitpunktes auf die mittlere Richtigkeit (ME) und Präzision (RMSE) der Abschätzung der typischen Modellparameter des PK-Modells

Parameter	ME, % (95 %-KI)	RMSE, %
CL <sub>Su</sub>	-2,8 (-2,9 - -2,6)	2,8
V1 <sub>Su</sub>	-4,4 (-4,6 - -4,2)	4,5
V2 <sub>Su</sub>	-19,9 (-21,0 - -18,8)	20,3
Q <sub>Su</sub>	-3,9 (-4,9 - -2,9)	5,2
CL <sub>Met</sub>	-2,8 (-2,9 - -2,7)	2,8
V1 <sub>Met</sub>	-7,2 (-7,4 - -7,0)	7,3
V2 <sub>Met</sub>	+0,4 (+0,2 - +0,6)	0,8
Q <sub>Met</sub>	+7,2 (+6,7 - +7,7)	7,4
<i>Interindividuelle Variabilität</i>		
$\eta_{CL_{Su}}$	+2,3 (+2,1 - +2,5)	2,4
$\eta_{CL_{Met}}$	+5,3 (+4,6 - +6,0)	5,9
$\eta_N$	+1,5 (-1,6 - +4,7)	11,3
<i>Restfehler</i>		
CV <sub>Su</sub>	+5,4 (+4,9 - +5,8)	5,6
CV <sub>Met</sub>	+1,8 (+1,6 - +1,9)	1,8

ME: mean prediction error; RMSE: root mean squared prediction error; Su: Sunitinib; Met: SU12662; CL: Clearance; V: Verteilungsvolumen; Q: interkompartimentelle Clearance; CV: Variationskoeffizient; KI: Konfidenzintervall

Bei Betrachtung der individuellen Bayes-Abschätzungen unter Berücksichtigung der interindividuellen Variabilität wurde ein mittlerer relativer Bias (95 %-KI) von +24,8 % (+14,8 - +35,3 %), -2,5 % (-2,9 - -2,1 %) und -2,5 % (-2,9 - -2,1 %) für N, CL<sub>Su</sub> und CL<sub>Met</sub> berechnet. Die Präzision lag hier jeweils bei 45,4, 2,6 und 2,6 %.



## 4.4 Pharmakokinetische/pharmakodynamische Modelle

### 4.4.1 Löslicher VEGF-Rezeptor 2

#### *Modellentwicklung und –evaluierung*

Zur Beschreibung des Konzentrations-Zeit-Verlaufs von sVEGFR-2 als Antwort auf die Sunitinibtherapie konnte das Strukturmodell, das zuvor für Probanden entwickelt worden war [97], auch für die Patienten mit kolorektalem Karzinom angewendet werden. Damit konnte die interindividuelle Variabilität für die Basiskonzentration ( $\Delta\text{OFV}$ :  $-90,281$ ,  $p < 0,001$ ) und die intrinsische Aktivität ( $\Delta\text{OFV}$ :  $-9,292$ ,  $p < 0,001$ ) abgeschätzt werden. Der Einschluss der IOV auf die Basiskonzentration verbesserte das Modell signifikant ( $\Delta\text{OFV}$ :  $-8,887$ ,  $p < 0,001$ ). Der Residualfehler wurde mit einem proportionalen Fehlermodell beschrieben (Appendix 4). Die typischen Parameterabschätzungen und das 90 %-Bootstrap-Konfidenzintervall sind in Tab. 4.14 aufgeführt.

Tab. 4.14 Abschätzungen der Modellparameter und das 90 %-Bootstrap-Konfidenzintervall für das PK/PD-Modell von sVEGFR-2

Parameter	Wert	90%-KI (Bootstrap)
<i>Strukturmodell</i>		
$\text{BL}_{\text{sVEGFR2}}$ [pg/mL]	8950,7	8330,1 - 9571,0
$\alpha_{\text{sVEGFR2}}$	1,26	1,02 - 1,51
$k_{\text{out}}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	0,00478	0,00422 - 0,00536
$K_{\text{d}}$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	4	fixiert [38]
<i>Statistisches Modell</i>		
$\eta_{\text{BLsVEGFR2}}$	0,166	0,099 - 0,209
$\eta_{\alpha}$	0,449	0,262 - 0,605
$\kappa_{\text{BLsVEGFR2}}$	0,067	0,046 - 0,087
<i>Restfehler</i>		
$\text{CV}_{\text{sVEGFR2}}$	7,44 %	5,82 - 9,05 %

BL: Basiswert;  $\alpha$ : intrinsische Aktivität;  $k_{\text{out}}$ : Eliminationskonstante;  $K_{\text{d}}$ : Dissoziationskonstante; CV: Variationskoeffizient; KI: Konfidenzintervall

Die Halbwertszeit von sVEGFR-2 im Plasma berechnet als  $\ln 2/k_{\text{out}}$  lag bei etwa 6 Tagen. Die Eta-Shrinkage ergab sich für  $\eta_{\text{BLsVEGFR2}}$  und  $\eta_{\alpha}$  zu 6,1 und 11,3 % und blieb damit unterhalb der zuvor festgelegten Grenze. Bei der Abschätzung der

*Interoccasion*-Variabilität näherten sich die empirischen Bayesschen Abschätzer (EBE) stärker dem Populationsmittelwert an, der Eta-Shrinkage-Effekt lag hier bei 46,9 und 51,1 % für Zyklus 1 und 2. Die Daten waren daher wenig. Kovariateneffekte könnten daher verstärkt oder verborgen sein. Individuelle Simulationen und eine Kovariatenanalyse waren daher für dieses Modell nicht gerechtfertigt. Die Mittelwerte waren allerdings alle nicht statistisch signifikant unterschiedlich von Null ( $p > 0,05$ ), sodass weiterhin von einer Standardnormalverteilung ausgegangen werden konnte. Der Epsilon-Shrinkage-Effekt lag im finalen Modell bei 17,1 %.

Die maximale Veränderung der sVEGFR-2-Plasmakonzentrationen wurde nach 29 Tagen erreicht und lag im Median bei 65 % (IQR: 62 - 67 %) des entsprechenden Basiswertes (Mittelwert  $\pm$  SD:  $64 \pm 4$  %) und daher in der gleichen Größenordnung wie die Beobachtungen (siehe 4.2.2).

Die diagnostischen Grafiken wiesen keine systematischen Fehlspezifikationen des Modells auf (Appendix 4). Die zentrale Tendenz und die Variabilität innerhalb der untersuchten Population wurden gut durch das Modell wiedergegeben (Abb. 4.13).

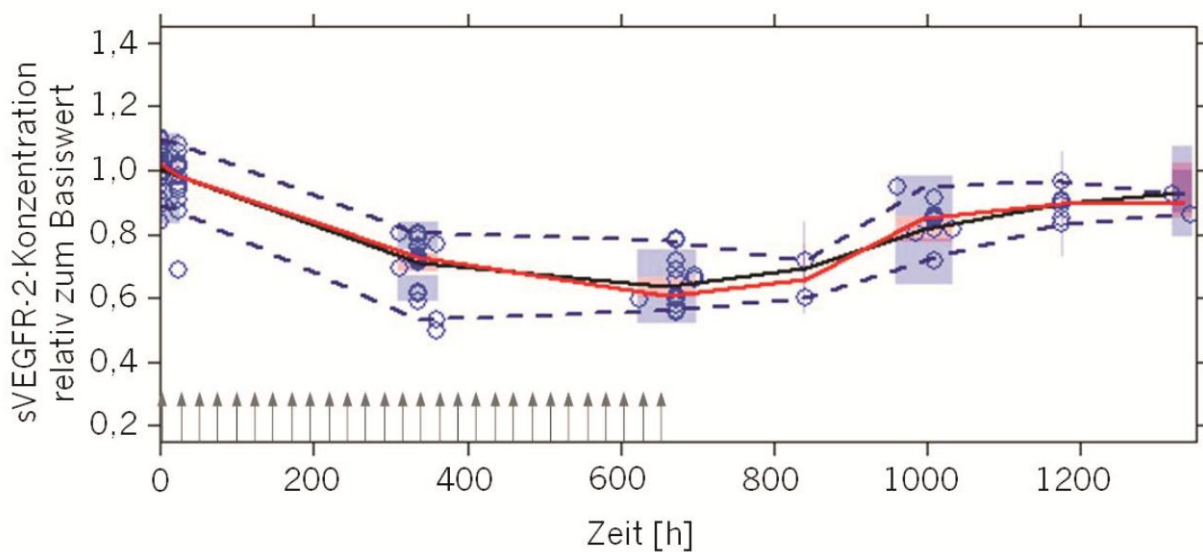


Abb. 4.13 Visual Predictive Check für die Plasmakonzentrationen von sVEGFR-2 relativ zum Basiswert ( $\circ$ ) zusammen mit dem Median ( $-$ ) und dem 5 und 95 %-Perzentil der Beobachtungen ( $---$ ) sowie mit dem Median ( $-$ ) und dem 95 %-Konfidenzintervall der 5 und 95 %-Perzentile ( $\blacksquare$ ) und des Medians ( $\blacksquare$ ) von 1000 Simulationen für eine vierwöchige Therapie mit 37,5 mg/Tag Sunitinib und anschließender Therapiepause.

*Sensitivitätsanalyse*

Auch für dieses Modell wurde der Einfluss der Dosierungszeit auf die Parameterabschätzung von sVEGFR-2 untersucht. Die Modellparameter wurden sehr präzise abgeschätzt, wenn die Dosierungszeit zufällig zwischen 7 und 10 Uhr variiert wurde. Sie wiesen nur geringe Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Modellen als auch im Vergleich zum Referenzmodell auf. Alle Abschätzungen lagen innerhalb des 90 %-Konfidenzintervalls des Referenzlaufes (vgl. Tab. 4.14). Die Beobachtungen ließen daher erwarten, dass der angenommene Einnahmezeitpunkt von Sunitinib innerhalb des nach Studienprotokoll vorgegeben Zeitfensters zu keinen erheblichen Veränderungen der Modellabschätzung führt (Tab. 4.15).

Tab. 4.15 Einfluss des Dosierungszeitpunktes auf die mittlere Richtigkeit und Präzision der Abschätzung der typischen Modellparameter des PK/PD-Modells für sVEGFR-2

Parameter	ME, % (95 %-KI)	RMSE, %
$BL_{sVEGFR2}$	0,0 <sup>1</sup>	0,0
$\alpha_{sVEGFR2}$	+0,79 <sup>1</sup>	0,79
$k_{out}$	+0,97 (-0,55 · +2,50)	5,48
<i>Interindividuelle Variabilität</i>		
$\eta_{BLsVEGFR2}$	+1,81 <sup>1</sup>	1,81
$\eta_{\alpha}$	+0,43 (+0,33 · +0,53)	0,55
$\kappa_{BL}$	+2,62 (+2,54 · +2,71)	2,64
<i>Residualfehler</i>		
$CV_{sVEGFR2}$	+0,16 (+0,14 · +0,18)	0,18

<sup>1</sup>bei allen Modellen wird der gleiche Wert abgeschätzt, keine Streuung; ME: mean prediction error; RMSE: root mean squared prediction error; BL: Basiswert;  $\alpha$ : intrinsische Aktivität;  $k_{out}$ : Eliminationskonstante; CV: Variationskoeffizient; KI: Konfidenzintervall

Die individuellen Bayes-Abschätzungen waren relativ robust hinsichtlich der Dosierungszeitpunkte. Sowohl der Basiswert als auch die intrinsische Aktivität wurden sehr präzise abgeschätzt. Der RMSE lag dabei im Mittel jeweils bei 0,36 bzw. 1,64 %. Für beide Parameter war ebenfalls kein systematischer Unterschied der Abschätzungen der Modellparameter zum Referenzdatensatz zu erkennen. Der ME lag im Mittel (95 %-KI) jeweils bei -0,02 % (-0,28 · 0,23 %) und bei 0,88 % (-0,03 · 1,79 %) für den Basiswert bzw. die intrinsische Aktivität.

#### 4.4.2 Löslicher VEGF-Rezeptor 3

Der mediane Konzentrations-Zeit-Verlauf von sVEGFR-3 wurde, wie der lösliche Rezeptor 2, ebenfalls am besten durch die invers-lineare Verknüpfung zwischen PK und PD zur Beschreibung des hemmenden Effekts charakterisiert. Der Wert der Objektiven Funktion war dabei bei gleicher Anzahl an Modellparametern um 1,129 besser als für das entsprechende  $E_{max}$ -Modell. Interindividuelle Variabilität konnte für den Basiswert ( $\Delta OFV$ :  $-209,636$ ,  $p > 0,001$ ) und die intrinsische Aktivität ( $\Delta OFV$ :  $-8,775$ ,  $p > 0,001$ ) abgeschätzt werden. Die Integration einer IOV auf den Basiswert ( $\Delta OFV$ :  $-3,818$   $p > 0,05$ ) oder die intrinsische Aktivität ( $\Delta OFV$ :  $-1,729$ ,  $p > 0,05$ ) führte zu keiner signifikanten Verbesserung des Modells. Abschätzungen der typischen Modellparameter und entsprechende 90 %-Bootstrap-Konfidenzintervalle sind in Tab. 4.16 angegeben.

Tab. 4.16 Abschätzungen der Modellparameter und das 90 %-Bootstrap-Konfidenzintervall für das PK/PD-Modell von sVEGFR-3

Parameter	Wert	90%-KI (Bootstrap)
<i>Strukturmodell</i>		
$BL_{sVEGFR3}$ [pg/mL]	21 900	17 922 - 27 029
$\alpha_{sVEGFR3}$	1,55	1,12 - 2,12
$k_{out}$ [ $h^{-1}$ ]	0,00505	0,00379 - 0,00689
$K_d$ [ $\mu g/mL$ ]	4	fixiert [38]
<i>Statistisches Modell</i>		
$\eta_{BLsVEGFR3}$	0,507	0,364 - 0,624
$\eta_{\alpha}$	0,550	0,211 - 0,890
<i>Restfehler</i>		
$CV_{sVEGFR3}$	15,2 %	11,9 - 17,7 %

BL: Basiswert;  $\alpha$ : intrinsische Aktivität;  $k_{out}$ : Eliminationskonstante;  $k_d$ : Dissoziationskonstante; CV: Variationskoeffizient; KI: Konfidenzintervall

Die Plasmahalbwertszeit von sVEGFR-3 lag bei 5,7 Tagen. Die Eta-Shrinkage Werte für  $\eta_{BLsVEGFR3}$ ,  $\eta_{\alpha}$  und die Epsilon-Shrinkage lagen jeweils bei  $-0,7$ ,  $19,7$  und  $12,0$  % und damit innerhalb der zuvor festgelegten Akzeptanzgrenzen. Auch die Mittelwerte der Abschätzungen der individuellen zufälligen Effekte unterschieden sich nicht signifikant von Null ( $p > 0,05$ ), sodass von einer Standardnormalverteilung der Etas ausgegangen werden kann.

Die grafische Darstellung zur Bewertung des Strukturmodells (OBS versus PRED) zeigte, dass insbesondere hohe Konzentrationen nur ungenau durch das Modell vorhergesagt werden konnten. Unter Berücksichtigung der IIV (OBS versus IPRED) war jedoch zu erkennen, dass das Modell die beobachteten Konzentrationen gut vorhersagt (Appendix 5). Maximale Veränderungen der Biomarkerkonzentrationen wurden nach 29 Tagen erreicht und lagen im Median bei 61 % des entsprechenden Basiswerts (IQR: 50 - 66 %) (Mittelwert  $\pm$  SD:  $58 \pm 11$  %). Sie spiegelten damit die beobachtete Reaktion des Biomarkers nach der Arzneistoffgabe sehr gut wider (siehe 4.2.3).

Der VPC verdeutlicht, dass der zentrale Verlauf und die Variabilität der betrachteten Population gut durch das Modell beschrieben wird (Abb. 4.15).

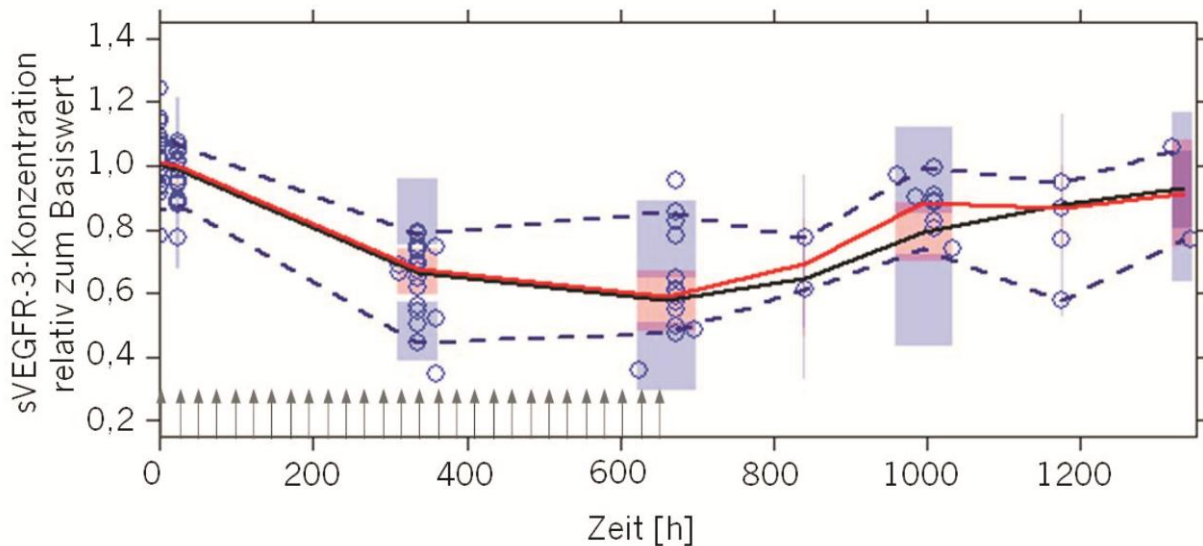


Abb. 4.14 Visual Predictive Check für die Plasmakonzentrationen von sVEGFR-3 relativ zum Basiswert (○) zusammen mit dem Median (—) und dem 5 und 95 %-Perzentil der Beobachtungen (---) sowie mit dem Median (—) und dem 95 %-Konfidenzintervall der 5 und 95 %-Perzentile (■) und des Medians (■) von 1000 Simulationen für eine vierwöchige Therapie mit 37,5 mg/Tag Sunitinib und anschließender Therapiepause.

## 4.5 Korrelationsanalysen

Mit Hilfe der Korrelationsanalyse wurde der Zusammenhang der beiden ausgewählten Biomarker sVEGFR-2 und sVEGFR-3 bei Probanden und Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom untersucht (Abb. 4.15).

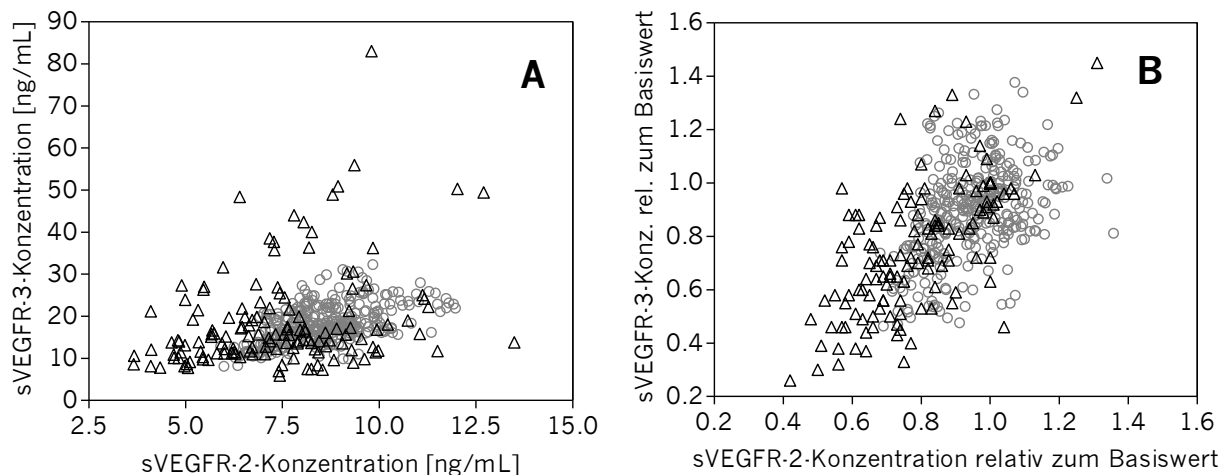


Abb. 4.15 Korrelationsanalyse zwischen sVEGFR-2 und sVEGFR-3 für Probanden (○) und Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom (Δ) aufgetragen als **A** absolute Konzentrationen und **B** als Konzentrationen relativ zum Basiswert.

Sowohl bei der Untersuchung der Konzentrationen als auch bei der auf den Basiswert bezogenen Werte wurde für beide Populationen ein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der Probanden und der Patienten unterscheiden sich dahingehend, dass bei den Probanden der Zusammenhang für die absoluten Konzentrationen und bei den Patienten für die relativen Konzentrationen stärker ausgeprägt war (Tab. 4.17).

Tab. 4.17 Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen sVEGFR-2 und sVEGFR-3

	Pearson		Spearman	
	Wert (95 %-KI)	p-Wert	Wert (95 %-KI)	p-Wert
<i>Probanden</i>				
Konzentration	0,514 (0,431-0,588)	< 0,0001	0,492 (0,404-0,571)	< 0,0001
rel. Konzentration	0,407 (0,314-0,492)	< 0,0001	0,409 (0,314-0,500)	< 0,0001
<i>mCRC-Patienten</i>				
Konzentration	0,313 (0,156-0,454)	0,0001	0,287 (0,124-0,436)	0,0005
rel. Konzentration	0,635 (0,526-0,724)	< 0,0001	0,702 (0,605-0,779)	< 0,0001

KI: Konfidenzintervall; mCRC: metastasierendes Kolorektalkarzinom

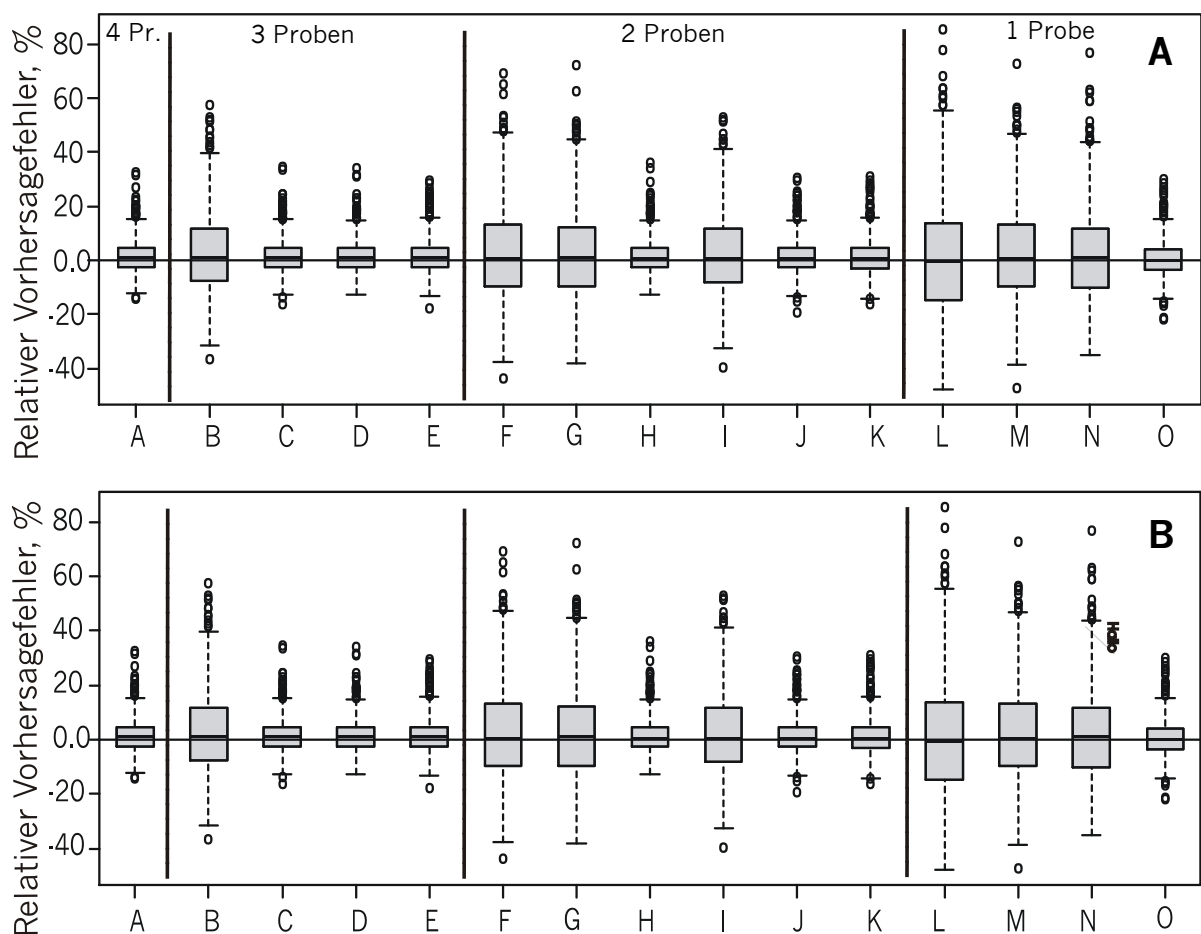
Die Ergebnisse der linearen Regression deuten darauf hin, dass das Ausmaß der Biomarkerantwort bei den Patienten für beide Biomarker vergleichbar war (y-

Abschnitt: 0,01, Steigung: 0,95), da der Ordinatenabschnitt nicht signifikant unterschiedlich von Null ist (0,01 (95 %-KI: -0,13 – 0,15)) und die Steigung nahe Eins liegt. Bei den Probanden hingegen ist der y-Abschnitt größer Null und die Steigung kleiner Eins, dass auf eine stärkere Biomarkerantwort von sVEGFR-2 hindeutet (y-Abschnitt: 0,3, Steigung: 0,63). Beschrieben über das Bestimmtheitsmaß der Regression erklärte das lineare Modell entsprechend jeweils 47 bzw. 17 % der beobachteten Variabilität der Biomarkerantwort der Patienten bzw. Probanden.

#### 4.6 Optimale Probenentnahme

In Abhängigkeit von der Anzahl und der Zeitpunkte der Probenentnahmen veränderte sich die Anpassungsgüte sowohl hinsichtlich der individuellen pharmakokinetischen als auch der pharmakodynamischen Parameter.

Bei der Betrachtung des relativen Vorhersagefehlers war zu erkennen, dass die mittlere Abschätzung weniger stark betroffen war als die Streuung des Fehlers zwischen den 1000 simulierten Patienten (Abb. 4.16).



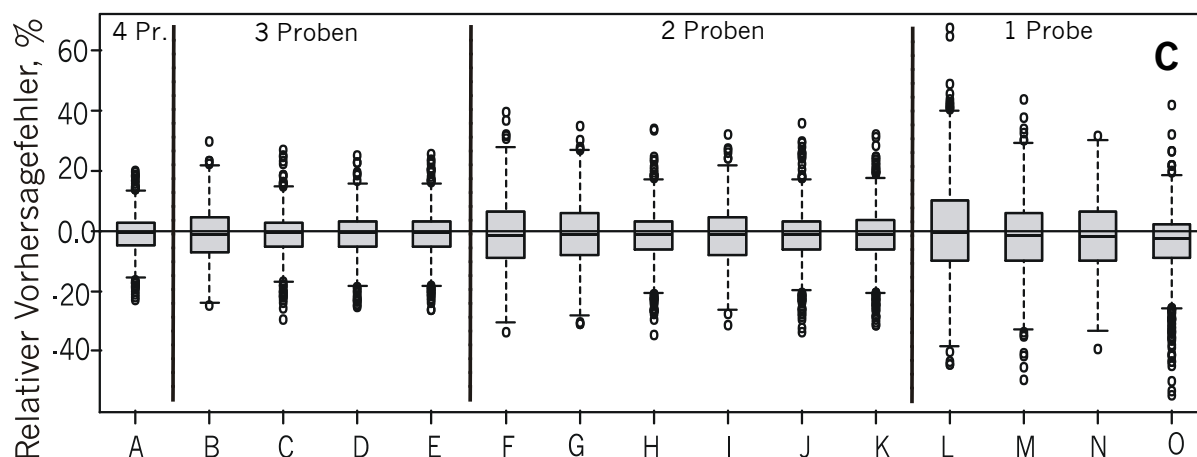


Abb. 4.16 Relativer Vorhersagefehler (RPE, %) für die individuelle Abschätzung **A** der Clearance von Sunitinib **B** der Clearance von SU12662 und **C** der  $AAUC_{ub,0-1008h}$  bei verschiedenen Probenentnahmeschemata: 4 Proben: A nach 24 h, 2, 4 und 6 Wochen; 3 Proben: B nach 24 h, 2 und 4 Wochen, C nach 24 h, 2 und 6 Wochen, D nach 24 h, 4 und 6 Wochen, E nach 2, 4 und 6 Wochen; 2 Proben: F nach 24 h und 2 Wochen, G nach 24 h und 4 Wochen, H nach 24 h und 6 Wochen, I nach 2 und 4 Wochen, J nach 2 und 6 Wochen, K nach 4 und 6 Wochen; 1 Probe: L nach 24 h, M nach 2 Wochen, N nach 4 Wochen und O nach 6 Wochen. Daten sind gegeben als Box-Whiskers-Plot.

AAUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve der aktiven Substanz; ub: ungebunden

Für eine gute Abschätzung der Clearance von Sunitinib und SU12662 war demnach eine Probe nach sechs Wochen Therapie wichtig. Für eine ausreichend gute Abschätzung der AUC sollte jedoch zusätzlich eine Blutprobe entweder nach zwei oder vier Wochen zur Bestimmung der Sunitinib- und SU12662-Konzentration entnommen werden. Die besten Abschätzungen wurden bei der Verwendung des Vierproben-Schemas (nach 24 h, 2, 4 und 6 Wochen) erreicht. Der ME und der RMSE lagen in diesem Fall jeweils bei +1,5 und 6,0 % ( $CL_{Su}$ ), +1,1 und 8,6 % ( $CL_{Met}$ ) und bei -0,9 und 6,3 % ( $AAUC_{ub,0-1008h}$ ) (Appendix 6). Ist jedoch aus praktischen Gründen die Entnahme von nur zwei Proben möglich, so lieferte eine Probenentnahme nach zwei und sechs Wochen basierend auf dem ME und dem RMSE die besten Abschätzungen (Appendix 6). Die visuelle Auswertung der Goodness-of-fit-Grafik des 2/6-Wochen-Schemas zeigte ebenfalls eine gute Abschätzung der Clearance für Sunitinib und der AUC, wies allerdings Abweichungen insbesondere bei hohen Werten für die Clearance des Metaboliten auf (Abb. 4.17).



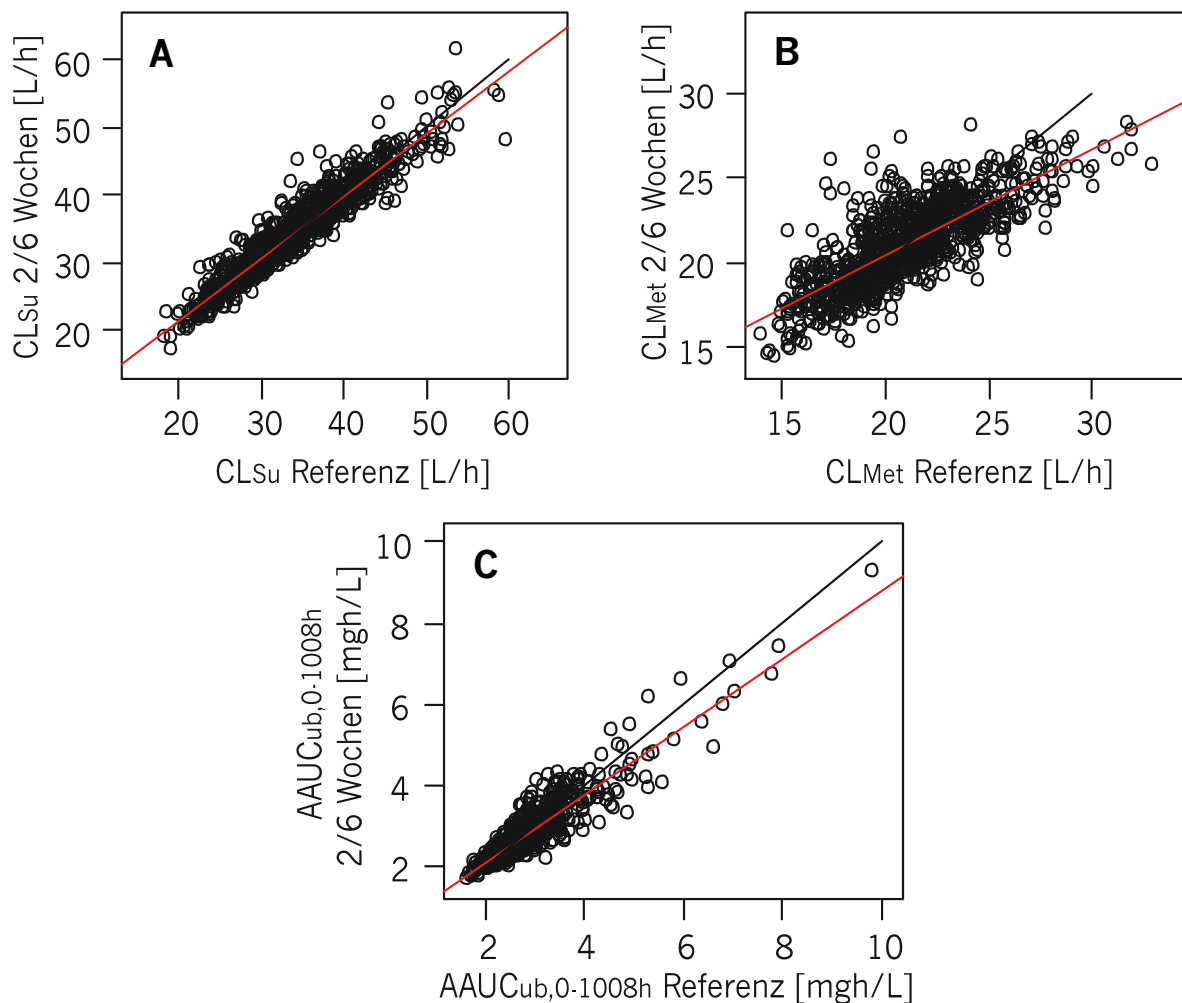


Abb. 4.17 Goodness-of-fit-Grafiken der individuellen Abschätzungen ( $\circ$ ) für **A** die Clearance von Sunitinib und **B** von SU12662 und **C** für die  $AUC_{ub,0-1008h}$  für die ungebundene aktive Substanz bei Probeentnahme nach zwei und sechs Wochen verglichen mit bei täglicher Messung. Die Anpassungsgüte wird mit Hilfe der Regressionsgeraden ( $-$ ) im Vergleich zur idealen Abschätzung ( $-$ ) dargestellt.

AAUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve für die aktive Substanz; ub: ungebunden

Im Hinblick auf die Abschätzungen der sVEGFR-2-Konzentrationen mit Hilfe des PK/PD-Modells unter Berücksichtigung der individuellen Parameterabschätzungen des PK-Modells bei jeweils gleicher Probenentnahme waren zum Teil große Fehlspezifikationen, die durch den relativen Vorhersagefehler quantifiziert wurden, zu erkennen (Abb. 4.18). Allerdings war die Streuung zwischen den Patienten trotz eines höheren RPE geringer ausgeprägt als bei der Abschätzung der individuellen pharmakokinetischen Parameter (Abb. 4.16).

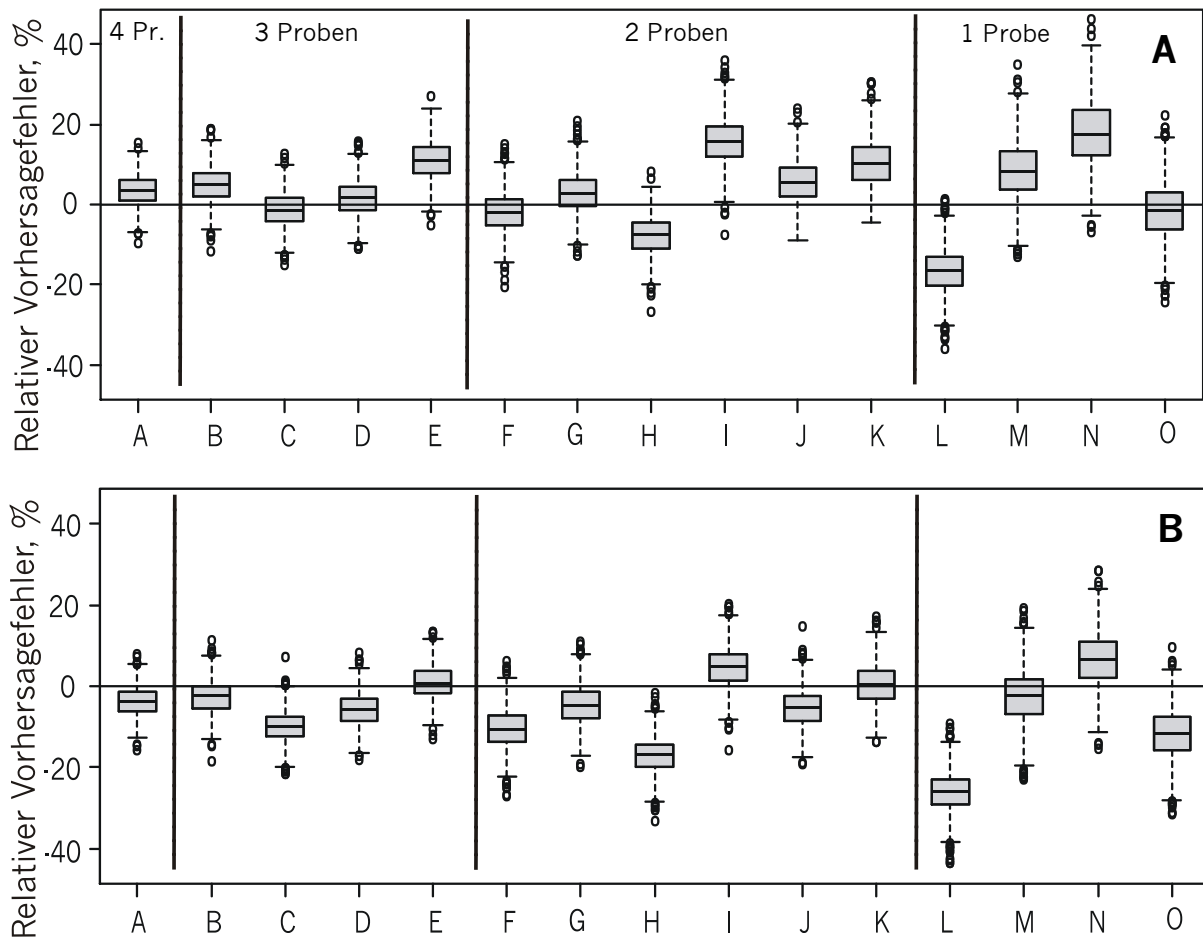


Abb. 4.18 Relativer Vorhersagefehler (RPE, %) für die individuelle Abschätzung **A** der Basiskonzentration von sVEGFR-2 und **B** der  $AUC_{sVEGFR-2,0-1008h}$  bei verschiedener Probeentnahme: 4 Proben: A nach 24 h, 2, 4 und 6 Wochen; 3 Proben: B nach 24 h, 2 und 4 Wochen, C nach 24 h, 2 und 6 Wochen, D nach 24 h, 4 und 6 Wochen, E nach 2, 4 und 6 Wochen; 2 Proben: F nach 24 h und 2 Wochen, G nach 24 h und 4 Wochen, H nach 24 h und 6 Wochen, I nach 2 und 4 Wochen, J nach 2 und 6 Wochen, K nach 4 und 6 Wochen; 1 Probe: L nach 24 h, M nach 2 Wochen, N nach 4 Wochen und O nach 6 Wochen. Daten sind gegeben als Box-Whiskers-Plot.

AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve

Sowohl für die Abschätzung der Basiskonzentration als auch für die der  $AUC_{sVEGFR-2,0-1008h}$  war das Entnahmeschema mit vier Proben pro Patient und Zyklus am besten geeignet. Der mittlere relative Vorhersagefehler (ME) lag hier jeweils bei +3,5 und -3,8 % und der RMSE bei 5,2 % für beide Parameter (Appendix 6). Ist auch hier aus praktischen Gründen nur die Entnahme von zwei Proben möglich, ist ebenfalls ein Entnahmeschema nach zwei und sechs Wochen zu empfehlen.

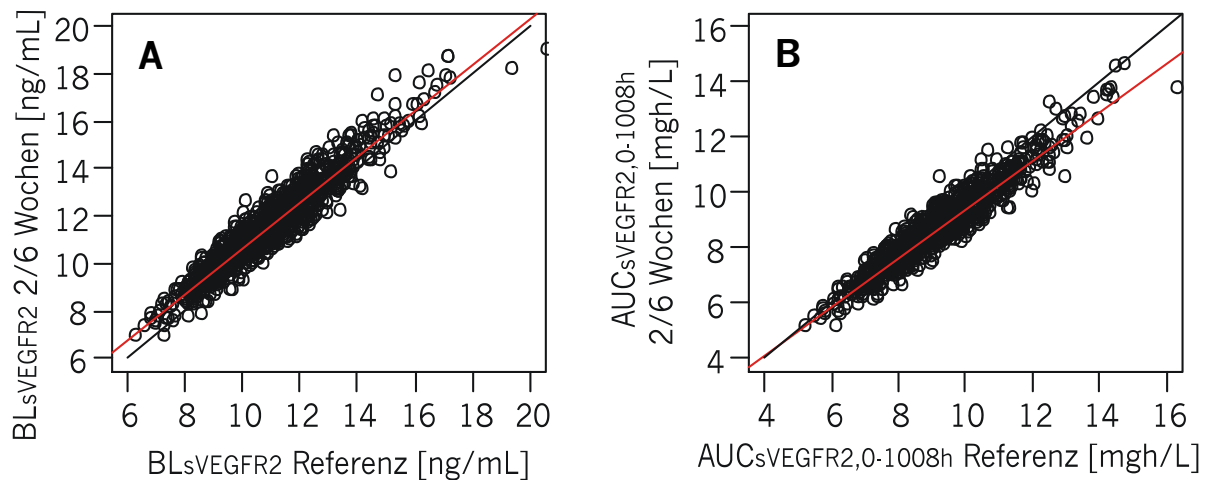


Abb. 4.19 Goodness-of-fit-Grafiken der individuellen Abschätzungen ( $\circ$ ) für **A** die Basiskonzentration und **B** die  $AUC_{sVEGFR2,0-1008h}$  für sVEGFR-2 bei einem Probenentnahmeschema nach zwei und sechs Wochen verglichen mit der Referenz bei täglicher Messung. Die Güte der Anpassung ist mit Hilfe der Regressionsgeraden (—) im Vergleich zur idealen Abschätzung (—) dargestellt.

AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve

Der ME und der RMSE lagen in diesem Fall bei +5,7 und 7,8 % für die Basiskonzentration und bei -5,2 und 7,1 % für die  $AUC_{sVEGFR2,0-1008h}$  (Appendix 6).

Zur genaueren Abschätzung des Basiswertes und zur Berechnung der tatsächlichen, relativen Konzentrationen sollte unter Umständen zusätzlich eine Blutprobe zu Beginn der Therapie abgenommen werden.

## 4.7 Überlebenszeitanalysen

### 4.7.1 Kaplan-Meier-Analyse

Bei elf der 21 Patienten wurde innerhalb der Beobachtungszeit der Studie eine Tumorprogression festgestellt. Die anderen zehn Patienten schieden vorzeitig aus der Studie aus und gingen daher als zensierte Daten in die Auswertung ein (Appendix 7). Die mediane Progressionszeit der 21 Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom lag unter der Therapie mit FOLFIRI in Kombination mit Sunitinib bei 11,1 Monaten.

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse wurde die Überlebensfunktion abgeschätzt. Da für vier Patienten nach Beendigung der Beobachtungszeit keine Progression festgestellt wurde, konnte die Überlebensfunktion nur bis zum letzten zensierten Zeitpunkt von

18 Monaten geschätzt werden. Die Wahrscheinlichkeit, bis zu diesem Zeitpunkt keine Progression zu erleiden, lag bei 31 % (Abb. 4.20).

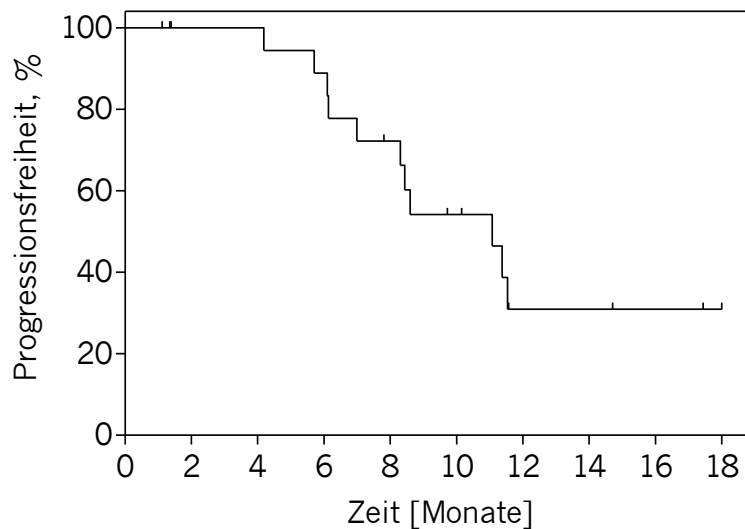


Abb. 4.20 Kaplan-Meier-Kurve zur Progressionsfreiheit der Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom unter der Therapie mit Folinat, Fluorouracil und Irinotecan in Kombination mit Sunitinib.

Nach der Aufteilung der Population in zwei Gruppen nach Merkmalsausprägung (z. B. Tumortyp, Geschlecht, Appendix 7) oder Kovariate (z. B. Konzentration oder AUC zum Zeitpunkt  $t$  von Substanz oder Biomarker, Appendix 7) mit dem Median als Trennungskriterium konnte für keine der untersuchten Kovariaten ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Appendix 7). Der größte Unterschied der Progressionskurven wurde nach der Stratifizierung hinsichtlich der AUC des löslichen VEGFR 2 über die ersten vier Wochen nach Therapiebeginn ( $AUC_{sVEGFR2,0-648h}$ ) beobachtet (Abb. 4.21).

Dabei war die mediane Zeit bis zur Progression (TTP) bei Patienten mit einer AUC kleiner oder gleich dem Populationsmedian von 4,67 mg·h/L und damit einer stärkeren Biomarkerantwort mit 11,5 Monaten länger als die für die Patienten mit einer AUC größer dem Median (8,5 Monate). Allerdings war auch diese Größe im Hinblick auf seine Prädiktivität statistisch nicht signifikant ( $p = 0,1961$ ).

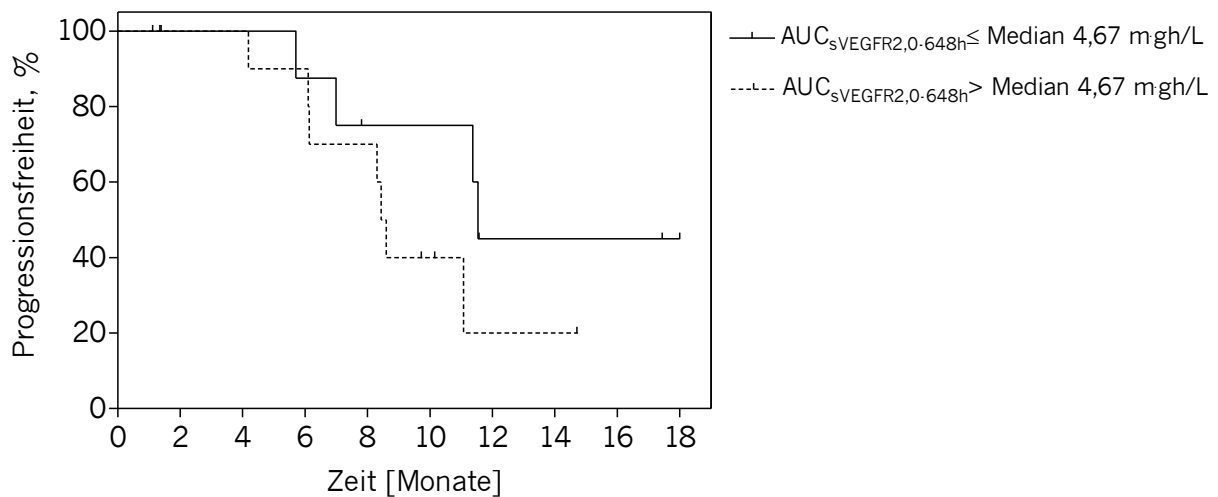


Abb. 4.21 Kaplan-Meier-Kurve zur Progressionsfreiheit für zwei Subgruppen von mCRC-Patienten eingeteilt nach der AUC von sVEGFR-2 über die ersten vier Wochen nach Therapiebeginn mit dem Populationsmedian als Grenzwert (*Log-Rank-Test*,  $p = 0,1961$ ).

AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve; mCRC: metastasierendes Kolorektalkarzinom

#### 4.7.2 Cox-Regression

Bei der univariaten Cox-Regression wurde ein schwacher Effekt des Alters als positiver Prädiktor auf die Zeit bis zur Progression identifiziert ( $\Delta\text{OFV}$ : 10,633,  $p < 0,05$ ). Die dazugehörige Hazard-Ratio hatte einen Wert von 0,87 (95 %-KI: 0,80 - 0,96). Alle anderen getesteten Merkmale zeigten keine statistisch signifikanten prädiktiven Eigenschaften auf die Zeit bis zur Progression ( $p > 0,1$ ) (Appendix 7).

Nach dem wiederholten Einschluss der Kovariaten zusammen mit dem Alter zeigte sich ein positiv signifikanter Effekt für die AUC im Steady-State ( $\text{AUC}_{\text{SS}}$ ) der freien Konzentration von Sunitinib und SU12662 ( $\Delta\text{OFV}$ : 6,951,  $p < 0,05$ ). Die HR lag in dieser multivariaten Analyse bei 0,82 (95 %-KI: 0,73 - 0,93,  $p = 0,0015$ ) und bei 0,009 (95 %-KI: 0,0002 - 0,403,  $p = 0,0152$ ) für das Alter und die  $\text{AUC}_{\text{SS}}$ . Die Wahrscheinlichkeit eher eine Progression zu erleiden, fiel bei einem Patienten mit der höchsten beobachteten  $\text{AUC}_{\text{SS}}$  von 1,48 ng·h/mL auf 17 % verglichen mit einem gleichaltrigen Patienten mit der niedrigsten  $\text{AUC}_{\text{SS}}$  von 0,63 ng·h/mL (HR: 0,018 (95 %-KI: 0,0007 - 0,46)). Bei gleicher  $\text{AUC}_{\text{SS}}$  fiel die Wahrscheinlichkeit entsprechend auf 27 % im Vergleich zu einem 5 Jahre jüngeren Patienten. Weitere Einflussfaktoren konnten nicht identifiziert werden.

### 4.7.3 PK/PD/Time-to-Event-Modell

#### Modellentwicklung

Die Zeit bis zur Progression konnte mit einem parametrischen *Time-to-Event*-Modell mit exponentieller Verteilung und einer Basishazardrate  $h_0$  von  $0,014 \text{ Wochen}^{-1}$  (95 %-KI:  $0,007 - 0,021 \text{ Wochen}^{-1}$ ) beschrieben werden. Die Einbeziehung der momentanen Plasmakonzentration an ungebundenem Sunitinib und SU12662 ( $AC_{ub}$ ) und die fortlaufende AUC des löslichen VEGF-Rezeptors 2 senkte den Wert der Objektiven Funktion jeweils um 6,137 ( $p < 0,05$ ) und 2,867 Punkte ( $p < 0,1$ ) und verbesserte das Modell signifikant. Im anschließenden Ausschlussverfahren, in dem strengere Akzeptanzkriterien galten ( $\alpha = 0,05$  statt  $\alpha = 0,1$ ), wurde die AUC als Prädiktor wieder aus dem Modell entfernt. Keine der untersuchten Kovariaten führte zu einer weiteren signifikanten Verbesserung des Modells (Appendix 7). Die Pharmakokinetik von Sunitinib beschrieben durch die  $AC_{ub}(t)$  war somit bei den betrachteten mCRC-Patienten der beste positive Prädiktor für die Zeit bis zur Progression. Die Hazard-Funktion  $h(t)$  konnte somit abhängig von der Plasmakonzentration  $AC_{ub}$  beschreiben werden (Gl. 4.1).

$$h(t) = h_0 \cdot e^{\beta \cdot C_{ub}(t)} \quad \text{Gl. 4.1}$$

Die typischen Modellparameter sind in Tab. 4.18 mit den entsprechenden 90 %-Bootstrap-Konfidenzintervallen angegeben.

Tab. 4.18 Modellparameter für das PK/TTE-Modell mit 90 %-Bootstrap-Konfidenzintervall

Strukturparameter	Wert	90 %-KI (Bootstrap)
$BL_{\text{Hazard}} [\text{Woche}^{-1}]$	0,0234	0,0121 - 0,0437
$\beta [\text{mL/ng}]$	-0,722	-1,644 - -0,336

BL: Basiswert; KI: Konfidenzintervall; TTE: Time-to-Event

Der zeitabhängige Verlauf der Hazard-Funktion in Abhängigkeit von der  $AC_{ub}(t)$  ist in Abb. 4.22 für einen typischen Patienten dargestellt, der über die Dauer eines Therapiezyklusses mit 37,5 mg Sunitinib behandelt wird. Entsprechend des Konzentrations-Zeit-Verlaufs nach peroraler Applikation von Sunitinib waren auch entsprechende Schwankungen im Verlauf der Hazard-Funktion zu beobachten (Abb. 4.22).

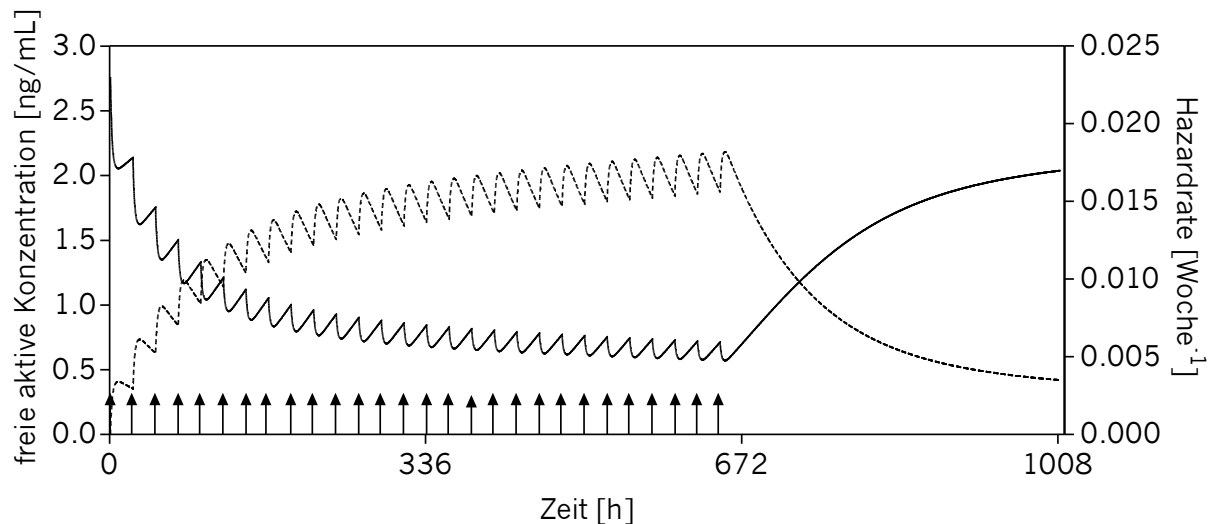


Abb. 4.22 Hazard-Funktion über die Zeit (—) in Abhängigkeit von der momentanen ungebundenen Plasmakonzentration von Sunitinib und SU12662 (---) für einen typischen Patienten für einen Therapiezyklus mit 37,5 mg Sunitinib pro Tag (↑) über 4 Wochen mit einer anschließenden 2-wöchigen Pause.

Da es sich um eine zeitabhängige Kovariante handelt, wird das relative Risiko auf eine Referenzpopulation bezogen, deren Kovariante sich um eine Einheit unterscheidet (vgl. Gl. 3.31). Das relative Risiko eines Patienten eine Progression zu erleiden lag demnach bei 0,48 verglichen mit denen, deren  $AC_{ub}$  um 1 ng/mL niedriger war.

#### Modellevaluierung

Der beobachtete Verlauf der Kaplan-Meier-Kurve zur Beschreibung der Zeit bis zur Progression der mCRC-Patienten lag innerhalb des vorhergesagten 90 %-Vorhersageintervalls und konnte damit ausreichend gut mit dem entwickelten PK/TTP-Modell beschrieben werden. Die zugrunde liegende Kaplan-Meier-Kurve der beobachteten Zeiten konnte aufgrund zensierter Beobachtungen nur bis zu einer Wahrscheinlichkeit von 31 %, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt keine Progression diagnostiziert wird, geschätzt werden (siehe 4.7.1) (Abb. 4.23). Ebenso konnte auch die Zeit bis zur Progression ab zwölf Monaten bis zum Ende der Beobachtungszeit mit Hilfe des PK/TTP-Modells nur ungenau abgeschätzt werden.

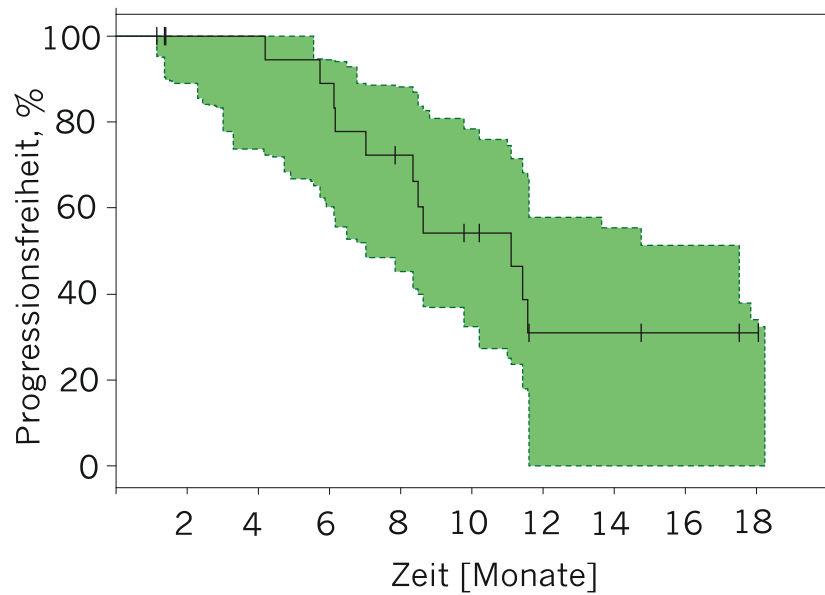


Abb. 4.23 Visual Predictive Check für die Kaplan-Meier-Kurve (—) zur Beschreibung der Wahrscheinlichkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt eine Progression zu erleiden mit dem 90 %-Vorhersageintervall (---) von 1000 Simulationen für die Patienten der C-II-005-Studie.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Cox-Regression wiesen auch die Ergebnisse aus dem modellbasierten Ansatz darauf hin, dass die Pharmakokinetik von Sunitinib bei den mCRC-Patienten prädigtiver für die Zeit bis zur Progression ist als die Biomarkerantwort der beiden löslichen Rezeptoren sVEGFR-2 und sVEGFR-3.



## 5. Diskussion

### 5.1 Validierung der sVEGFR-3-Bestimmungsmethode

Trotz bereits veröffentlichter Plasmakonzentrationen von sVEGFR-3 stehen nur Beschreibungen [99], aber keine Angaben zur Validierung einer entsprechenden Bestimmungsmethode zur Verfügung [19,67-69,71,74,75,138]. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig anhand der geltenden Leitlinien der FDA und der EMA [77,79] und spezieller Empfehlungen für ligandenbindende Assays [59,62,78,80,81,102-104,106] ein Sandwich-ELISA zur Bestimmung der sVEGFR-3-Konzentration in humanem Plasma validiert werden. Selektivität, Parallelität, Präzision und Richtigkeit, Stabilität, Robustheit und Anwendbarkeit konnten dabei nachgewiesen werden.

#### *Methode und Reagenzien*

Immunoassays dienen als Goldstandard zur Quantifizierung proteinogener Analyten, zu denen auch VEGF-A und die beiden löslichen VEGF-Rezeptoren 2 und 3 gehören [139]. Aufgrund der biologischen Herkunft der in Immunoassays verwendeten Standard- und Antikörperlösungen und der Antigen-Antikörper-Reaktion selbst sind Immunoassays häufig weniger präzise als chromatographische Methoden. Deshalb werden die Akzeptanzkriterien während der Validierung und der Messung von Studienproben auf 20 % (25 % am LLOQ) festgelegt [59,77,78,81,103,140,141] und sind damit weniger streng als die in der Chromatographie verwendeten 15 % (20 % am LLOQ) [59]. Einen weiteren kritischen Punkt der Validierung stellt der Referenzstandard dar, der rekombinant hergestellt wird [105] und damit das endogene sVEGFR-3 nicht vollkommen repräsentiert [139]. Informationen zu möglichen Spleiß-Varianten gibt es allerdings nur für VEGFR-3, aber nicht für seine lösliche Form [142]. Voraussetzung für die Bestimmung des endogenen Analyten relativ zur Referenz mit reproduzierbaren Ergebnissen ist ein konsistentes Herstellungsverfahren, das zu vergleichbarem Referenzmaterial zwischen den Chargen führt [139]. Im Rahmen der Validierung und der Messung der Studienproben wurde nur eine Charge verwendet, sodass mögliche Unterschiede zwischen den Chargen nicht untersucht werden konnten. Der Hersteller garantiert jedoch die Vergleichbarkeit der Chargen, indem der Standard einer neuen Charge gegen den einer alten kalibriert wird (CV und RE:  $\pm 10\%$ ). Bei anstehendem Chargenwechsel des Standards ist das gleiche Vorgehen geplant [139].

### *Selektivität*

Die Selektivität wird im Allgemeinen anhand von reinen und gespickten Plasmaproben mit Konzentrationen nahe der Quantifizierungsgrenze bestimmt [77,81,104]. Da jedoch das zu bestimmende sVEGFR-3 endogen im Plasma enthalten ist und eine prä-analytische Extraktion des Analyten zur Gewinnung von analytfreier Matrix kaum möglich ist [59,78,81,140], wurden niedrige Konzentrationen durch entsprechende Verdünnungsreihen des Plasmas hergestellt. Verdünnungseffekte möglicher Störkomponenten, die mangelnde Selektivität maskieren könnten, sind dabei nicht auszuschließen. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Plasmaproben in geeigneter Verdünnung mit verschiedenen Konzentrationen des Analyten versetzt. Auch potentielle Interaktionen zwischen rekombinantem und endogenem sVEGFR-3 wurden durch die Bestimmung der Richtigkeit in gemischten Proben verschiedener Probanden ohne Zugabe des rekombinanten Analyten berücksichtigt. Somit konnte die Richtigkeit und Wiederfindung im Plasma für verschiedene Konzentrationen und Verdünnungen sowie für Proben ohne rekombinantem sVEGFR-3 untersucht werden. Weder die Verdünnungslinearität noch die Richtigkeit und Wiederfindung deuten auf mangelnde Selektivität innerhalb der für die Studienproben validierten Plasmaverdünnungen zwischen 1:6 und 1:16 hin. Der beobachtete negative Bias kann durch verschiedene im Plasma enthaltene Bestandteile verursacht werden. Allerdings ist zu erwarten, dass mögliche Matrixeffekte gering sind, da die Richtigkeit innerhalb der definierten Akzeptanzkriterien lag und keine Unterschiede zwischen den Verdünnungen zu erkennen waren.

Die Selektivität wurde allerdings nur für gesunde Probanden untersucht, obwohl die Zusammensetzung der Matrix und damit die Matrixeffekte durchaus unterschiedlich zwischen Individuen einer Population und zwischen Probanden und Patienten sein können [77,78]. Die geringen interindividuellen Unterschiede zwischen den Probanden und die gute Verdünnungslinearität lassen allerdings vermuten, dass die Selektivität auch bei Patientenproben in der empfohlenen 1:10-Verdünnung gegeben ist. Zu den bekannten variablen Faktoren, die die Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion stören können und damit zu Matrixeffekten führen, gehören u.a. Hyperlipidämie, Hämolyse, Ionenstärke, pH-Wert, Kationen, Viskosität der Probe, Serumproteine (z. B. Komplement- oder Rheumafaktoren), Antikoagulantien, Proteasen, Bindungsproteine, Autoantikörper und heterophile anti-IgG-Antikörper [59,76-80]. Auch können durch vorangegangene Therapien mit murinen oder auch chimären monoklonalen Antikörpern humane anti-Maus-Antikörper (HAMA) entwickelt worden sein, die durch Brückenbildung zwischen dem Anhaftungs- und dem Detektionsantikörper, wie die

heterophilen Antikörper, zu falsch positiven Messsignalen führen können. Diese Bindungen sind allerdings oft nur schwach, sodass Störeffekte insbesondere bei geringen Analytkonzentrationen und geringen Probenverdünnungen von Bedeutung sind und daher nicht in hohem Maße in den zu untersuchenden Validierungs- und Studienproben zu erwarten waren [76,140]. Zudem wurde der CrossDown<sup>TM</sup>-Puffer zur Verdünnung der Plasmaproben verwendet, der mit einem speziellen Wirkprinzip nicht-spezifische Störeffekte, die auf niedrig- und mittelaffinen Bindungen beruhen, verhindert und nur hochaffine Bindungen zulässt [76,110].

Mögliche störende Effekte der Medikation, in diesem Fall bestehend aus Sunitinib in beiden Populationen und Caliciumfolinat, Fluorouracil und Irinotecan zusätzlich bei den Patienten, auf die Antigen-Antikörper-Reaktion wurden nicht untersucht. Allerdings wurde aufgrund der fehlenden proteinogenen Struktur der Arzneistoffe keine direkte Interaktion mit der Antigen-Antikörper-Reaktion erwartet. Veränderungen des pH-Wertes, der Ionenstärke oder der Kationenkonzentration sollten wegen ausreichender Verdünnung der Plasmaproben und der Verwendung eines Puffers nicht ins Gewicht gefallen sein.

#### *Parallelität*

Im Rahmen der Validierung wurde die Parallelität zwischen der Standardkurve in der Surrogatmatrix und reihenweise verdünnter Studienproben untersucht, um potentielle Matrixeffekte zu identifizieren [77]. Zur Verdünnung der Plasmaproben kann Puffer [104], das Verdünnungsmittel, das für die Standardproben benutzt wird [80] oder idealerweise analytfreie Studienmatrix verwendet werden [77,80]. Puffer wurde bei der Untersuchung der Verdünnungslinearität verwendet und führte zu den oben genannten Verdünnungseffekten der Störsubstanzen. Eine Verdünnung mit der Surrogatmatrix fetales Kälberserum kann *in vitro* zu weiteren Interferenzen zwischen Bestandteilen des Kälberserums und des menschlichen Plasmas führen, die *in vivo* keine Rolle spielen und zu falschen Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurden alle Plasmaproben im gleichen Verhältnis, das auch zur Verdünnung der Studienproben verwendet wurde (1:10 und 1:14), mit Puffer versetzt, der verschiedene Konzentrationen des rekombinanten Analyten enthielt. Damit war die Zusammensetzung der Validierungs- und Studienproben vergleichbar und kam der von der EMA empfohlenen Verdünnung mit analytfreier Studienmatrix zur Bestimmung der Parallelität sehr nahe [77]. Die Parallelität kann auf verschiedene Weisen beurteilt werden. Häufig wird dabei die verdünnungsangepasste Konzentration gegen die Verdünnung grafisch dargestellt. Parallelität ist in diesem Fall gegeben, wenn die Steigung der Kurven annähernd 1 ist.

Harte Akzeptanzkriterien hinsichtlich der Steigung existieren allerdings nicht [104]. Die in dieser Arbeit verwendete grafische Darstellung der Präzision ist ebenfalls eine visuelle Auswertung, hat jedoch den Vorteil, dass sie die Parallelität in ihrer ursprünglichen Definition als Vergleich der Konzentrations-Absorptionsprofile darstellt.

#### *Präzision und Richtigkeit*

Präzision und Richtigkeit wurden im Plasma eines Probanden an sechs verschiedenen Tagen bestimmt, um die Studienbedingungen möglichst gut wiederzugeben [80,81,141]. Da die Zusammensetzung der Matrix sehr variabel zwischen einzelnen Individuen sein kann [78], wurde die Präzision und Richtigkeit im Plasma von vier weiteren Probanden in Doppelbestimmung ermittelt. Eine generelle Schwierigkeit bei der Bestimmung der Richtigkeit ist die Definition der sVEGFR-3-Konzentration, die endogen in der Probe vorliegt und als Referenzkonzentration zur Berechnung des relativen Fehlers herangezogen wird [78,140]. Aufgrund fehlender Referenzmethoden galt die Summe aus der zugesetzten Analytkonzentration und der Konzentration in einer Probe reinen Plasmas als Referenzkonzentration [59]. Dieser Wert kann insbesondere in frühen Phasen der Validierung fehlerbehaftet sein, wenn die Optimierung der Methode noch nicht abgeschlossen ist. Weitere Effekte wie unspezifische Matrixeffekte oder die Veränderung der Epitope nach Bindung an Bindungsproteine oder Liganden sind schwierig zu quantifizieren und erschweren die Bestimmung des Referenzwertes. Die niedrig- und mittelaffinen Bindungen an die Antikörper des Assays sollten jedoch durch den verwendeten CrossDown<sup>TM</sup>-Puffer verhindert worden sein [78,110]. Ein falsch bestimmter Basiswert wirkt sich jedoch aufgrund der nichtlinearen Beziehung (hyperboler Kurvenverlauf) zwischen Konzentration und Absorption insbesondere auf Proben im mittleren Konzentrationsbereich aus, sodass der relative Fehler in diesem Fall außerhalb der Spezifikationen liegen könnte. Da jedoch weder der Variationskoeffizient noch der relative Fehler die von der EMA für Immunoassays empfohlenen Akzeptanzgrenzen [77] überschritt und Parallelität zwischen Surrogat- und Studienmatrix gegeben war (siehe Abb. 4.2), wird davon ausgegangen, dass die Bestimmungsmethode valide und der Analyt mit ausreichender Präzision und Richtigkeit im untersuchten Bereich quantifiziert werden konnte.

#### *Stabilität*

Die Stabilität wurde während der Validierung und darüber hinaus während der Messung der Studienproben untersucht. Dadurch sind Aussagen zur Stabilität des

Analyten im Plasma auch für Proben möglich, die aus unterschiedlichen Gründen lange gelagert worden sind, bevor sie vermessen werden können. Es gab keine Hinweise auf eine mangelnde Stabilität des Analyten im Plasma nach drei Einfrier-Auftauzyklen und nach ein- bzw. 15-monatiger Lagerung bei  $-20$  bzw.  $-80$  °C. Verglichen mit der *Pre-Study*-Validierung, in der für die Langzeitstabilitätsproben eine Zunahme der bestimmten Konzentrationen beobachtet wurde, war die Abweichung von der Referenzkonzentration zu Beginn bei Betrachtung des gesamten Zeitraums negativ. Zudem war die Variabilität dieser Proben über den gesamten Zeitraum sehr hoch. Da jedoch kein Trend zu geringeren Konzentrationen über die Zeit festgestellt wurde, wird davon ausgegangen, dass die hohe *Between-day*-Variabilität der Proben kein Hinweis einer Instabilität des Analyten im Plasma war, sondern die häufig bei Immunoassays zu beobachtende hohe Variabilität widerspiegelte [59,77,78,81,103,140,141].

#### *Robustheit*

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Schüttelprozess und die Wahl der Surrogatmatrix kritische Aspekte hinsichtlich der Robustheit der Methode sind. Die Wahl der Inkubationstemperatur in einem bestimmten Bereich schien dagegen weniger ausschlaggebend für die Qualität der Messungen zu sein. Antikörper besitzen spezifische Epitope, die selektiv bestimmte Antigene binden können. Für die Bindung ist ein enger Kontakt zwischen Antigen und Antikörper essentiell, damit die initial vorherrschenden Abstoßungskräfte überwunden werden. Das leichte Schütteln während der Bindungsreaktionen steigert die Mobilität des Analyten, sodass die Wahrscheinlichkeit eines Antigen-Antikörperkontakts zunimmt und eine quantitative Bindung des Analyten erleichtert wird [76]. Ein Wechsel der Surrogatmatrix führte dabei zu Unterschieden in den absoluten beobachteten Konzentrationen von sVEGFR-3. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Unterschied der Konzentrationen in den Proben eines Individuums, die anhand von Kalibrierkurven verschiedener Surrogatmatrizes ermittelt wurden, proportional zueinander waren. Damit wurden relative Konzentrationen kaum durch die Wahl der Surrogatmatrix beeinflusst. Ein Vergleich zwischen Studiendaten verschiedener Labore erscheint daher hinsichtlich der absoluten Konzentrationen von sVEGFR-3 schwierig. Für relative Konzentrationen, die bereits als mögliche Prädiktoren in klinischen Studien untersucht wurden [19,67-69,71,74,138], sollte ein Vergleich jedoch unproblematisch sein. Aufgrund dieser Problematik sind viele Biomarkerassays typischerweise eher zur Bestimmung relativer als absoluter Konzentrationen geeignet [100]. Trotzdem sollten

die Proben eines Probanden/Patienten auf einer 96-Well-Platte analysiert werden, um Matrixunterschiede und die hohe beobachtete *Between-day*-Variabilität vernachlässigen zu können.

#### *In-Study-Validierung und Qualitätssicherung während der Messungen*

Während der *In-Study*-Validierung wurden die Standard- und QC-Proben zur Beurteilung der Analysenakzeptanz herangezogen [59,81]. Die QC-Proben enthielten allerdings die Surrogatmatrix und können daher nicht direkt die Validität der Messung in der Studienmatrix sicherstellen. Da jedoch ausreichende Präzision und Richtigkeit sowie Verdünnungslinearität und Parallelität zwischen der Surrogat- und der Studienmatrix nachgewiesen werden konnte und damit Matrixeffekte nicht wahrscheinlich waren, wurden die QC-Proben auch in der Surrogatmatrix hergestellt [59,78].

## 5.2 Probenaufbereitung und Analytik

Zur Beschreibung der Pharmakokinetik und -dynamik von Arzneistoffen und Biomarkern ebenso wie für den Prozess der Biomarkervalidierung sind validierte analytische Methoden essentiell. Dabei wird gefordert, dass der Analyt mit ausreichender Präzision und Richtigkeit in der Studienprobe quantifiziert werden kann. Des Weiteren spielt eine hinreichende präanalytische Robustheit für die Eignung eines Biomarkers eine wichtige Rolle, um sicherzustellen, dass durch die Probenaufbereitung keine Verfälschungen der Konzentration zu erwarten sind [66].

Sowohl für Sunitinib und SU12662 als auch für die drei untersuchten Biomarker VEGF-A, sVEGFR-2 und sVEGFR-3 stehen entsprechende validierte Methoden zur Quantifizierung in Plasma zur Verfügung [108,143,144].

Entgegen der Beobachtungen vieler publizierter Studien an Gesunden [97] und Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen [19,67,68,70-74], die einen Anstieg der VEGF-A-Konzentration nach beginnender Sunitinibeinnahme beschrieben haben, konnten im Rahmen der C-II-005-Studie steigende VEGF-A-Konzentrationen nur bei den Patienten des Studienzentrums 1 beobachtet werden (Abb. 4.6 B). Eine solche studienzentrenabhängige Biomarkerreaktion zeigten die beiden löslichen Rezeptoren nicht (siehe Abb. 4.8 B und Abb. 4.10 B). Mögliche Ursachen dafür können in der präanalytischen Probenaufbereitung zu finden sein, die in den jeweiligen Zentren stattfindet. Dazu gehören u.a. die Art der Blutentnahme, das verwendete Antikoagulans zur Gewinnung von Plasma und die Zentrifugation. In der

Probandenstudie wurden statistisch signifikant unterschiedliche VEGF-A-Basiskonzentrationen zwischen den Studienphasen beobachtet, die sich hinsichtlich der verwendeten relativen Zentrifugalbeschleunigung voneinander unterschieden [97]. Anschließende Versuche mit verschiedenen Zentrifugalbeschleunigungen konnten einen Einfluss der relativen Zentrifugalbeschleunigung bestätigen (siehe Abb. 4.7). Es ist bekannt, dass freies VEGF-A von Thrombozyten in der Zirkulation aufgenommen, in den  $\alpha$ -Granula gespeichert und während der Aggregation freigesetzt wird [145]. Eine steigende relative Zentrifugalbeschleunigung führt damit über eine zunehmende Verarmung an Thrombozyten im Plasma zu einer Verminderung der Menge an VEGF-A, das durch die Aktivierung von Thrombozyten freigesetzt wird und zu höheren beobachteten Konzentrationen führt. Bei hohen Zentrifugalbeschleunigungen ist allerdings ein erneuter Anstieg der beobachteten VEGF-A-Plasmakonzentrationen zu erwarten, da durch die erhöhte Scherung während der Zentrifugation Thrombozyten aktiviert werden können [111]. Präanalytische Bedingungen, wie z. B. die Wahl der relativen Zentrifugalbeschleunigung, die Dauer der Zentrifugation, die Dauer und Temperatur der Lagerung nach der Blutentnahme sowie die Wahl des Antikoagulans oder die Blutgerinnungsdauer zur Gewinnung von Plasma bzw. Serum, können zu einer Aktivierung der Thrombozyten beitragen. Diese können daher *ex vivo* zu einer Zunahme der VEGF-A-Plasmakonzentrationen führen [111,146,147]. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die VEGF-A-Plasmakonzentrationen signifikant niedriger sind als die im Serum [25,26,111,145,146,148-150]. In die Diskussion zur idealen Matrix für die Quantifizierung von VEGF-A gehen daher die Anzahl der Thrombozyten, die Neigung zur Aggregation sowie die Menge an VEGF-A pro Plättchen als potentielle Einflussfaktoren ein [25,26,145,148,149,151].

Für beide löslichen Rezeptoren sind solche präanalytischen Probleme nicht bekannt. Plasma- und Serumkonzentrationen unterschieden sich weder für sVEGFR-2 ( $p > 0,05$ ) [152] noch für sVEGFR-3 ( $p = 0,75$ ) [99] signifikant voneinander.

Aufgrund der hohen Variabilität der VEGF-A-Konzentrationen abhängig von der präanalytischen Probenaufbereitung und der Schwierigkeit, ein standardisiertes Verfahren zu etablieren, scheint VEGF-A als Biomarker weniger gut geeignet zu sein als die beiden löslichen Rezeptoren 2 und 3 [147,152].

### 5.3 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von Sunitinib und SU12662 bei Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom konnte ausreichend gut mit dem pharmakokinetischen Modell

beschrieben werden, das auf einem zuvor für Probanden entwickelten Modell basierte [97]. Das Einfügen eines zweiten Kompartiments war jedoch nötig, um den beobachteten zweiphasigen Abfall der Konzentrations-Zeit-Kurve des Metaboliten zu berücksichtigen, der auch zuvor im Rahmen einer pharmakokinetischen Auswertung von Gesunden und Krebspatienten mit verschiedenen Tumorentitäten beschrieben worden war [43]. Die Abschätzung des peripheren Verteilungsvolumens von Sunitinib führte jedoch zu einer Instabilität des Modells. Aus diesem Grund wurde dieses auf einen zu Beginn abgeschätzten Wert fixiert, der mit einem in der Literatur beschriebenen Wert vergleichbar ist [43]. Die datenarme Situation führte dazu, dass auch die Absorptionsphase für das Patientenkollektiv nicht beschrieben werden konnte. Daher wurden die entsprechenden Parameter auf die Werte der Probanden fixiert, für die ausreichend Daten in der Absorptionsphase zur Verfügung standen [97]. Zur Berücksichtigung der hohen interindividuellen Variabilität in der Absorptionsphase, die u.a. durch unerwünschte Wirkungen der komedizierten FOLFIRI-Regime, wie Mukositis, bedingt sein kann, wurde die Abschätzung einer Variabilität auf die Anzahl der Transitkompartimente  $N$ , einem Absorptionsparameter, in dem Modell zugelassen. Da Sunitinib vor allem in der Leber über das Cytochrom P450-System metabolisiert wird, können Leberfunktionsstörungen und eine variierende Enzymaktivität zu interindividuellen Unterschieden führen [33]. Eine solche in früheren Studien beobachtete Variabilität im Bereich der Metabolisierung wurde durch die Abschätzung der interindividuellen Variabilität der Clearance beider aktiver Substanzen berücksichtigt.

Die Sensitivitätsanalyse ergab, dass das Modell gegenüber variierenden fixierten Werten für die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante  $K_A$  relativ stabil war, Veränderungen der mittleren Transitzeit  $MTT$  und des Verhältnisses präsystemischer zu systemischer Metabolisierung ( $RPS$ ) sich allerdings stärker auf die interkompartimentelle Clearance beider Substanzen und das zentrale Verteilungsvolumen von SU12662 auswirkten. Die Clearance beider Substanzen war dagegen robust bei Veränderungen der Annahmen zur Absorption und ist vergleichbar mit früheren Untersuchungen [43]. Alternativ zu fixierten Werten [124] können in datenarmen Situationen auch *a-priori*-Informationen in das Modell integriert werden, um eine Abschätzung zu ermöglichen [153]. Weitere Einflussfaktoren, die zu fehlerhaften Parameterabschätzungen und überschätzter Variabilität führen können, sind die fehlenden Informationen zum exakten Dosierungszeitpunkt [125] und der Adhärenz der Patienten unter der Sunitinibtherapie [154]. Simulationen zeigten, dass die Variation des Dosierungszeitpunktes zu stark variierenden individuellen



Abschätzungen der Absorption ( $EBE_N$ ) führt, die anderen Parameter hingegen kaum betroffen sind. Es ist bekannt, dass das Wissen über den genauen Dosierungszeitpunkt und die Adhärenz der Patienten eine gute Abschätzung mit geringer Variabilität ermöglicht [154]. Auch im Rahmen der Masterarbeit von Katrin Rebekka Weidner wurde gezeigt, dass mit steigendem Grad an unbekannter Non-Adhärenz die Abschätzung des Verteilungsvolumens und der Clearance von Sunitinib sowie die Gesamt-AUC überschätzt werden [155]. Eine mangelnde Adhärenz der Patienten kann daher eine Ursache für die hohe beobachtete interindividuelle und Restvariabilität der beobachteten Sunitinibkonzentrationen und damit der entsprechenden Modellvorhersagen sein (siehe Tab. 4.12).

Trotz fehlender Hinweise auf Unterschiede in der Absorption zwischen Probanden und Patienten [43] wäre es sinnvoll, im Rahmen einer Studie Absorptionsdaten von Patienten zu erheben, um die Modellabschätzungen mit Daten zu stützen und damit einen potentiellen Bias in deren Abschätzung und der Variabilität der übrigen Modellparameter zu vermeiden [153,154].

#### 5.4 Die löslichen VEGF-Rezeptoren als Biomarker

Alle drei Biomarker konnten mit ausreichender Qualität und validierten Methoden quantifiziert werden. Entsprechend früherer Erkenntnisse aus der Literatur für Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten [19,67-74,99] wurde für beide löslichen Rezeptoren für die Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom, aber auch für die Probanden, ein sunitinibabhängiger Abfall der Biomarkerkonzentration mit anschließendem Wiederanstieg nach Therapieende beobachtet. Der auch bei Gesunden bestehende zeitliche Zusammenhang zwischen Biomarkerreaktion und Sunitinibapplikation deutet darauf hin, dass sowohl sVEGFR-2 als auch sVEGFR-3 pharmakodynamische Marker der Sunitinibaktivität sind [19].

Ein ähnliches Biomarkerprofil zeigte sich auch in Studien mit anderen antiangiogenen Tyrosinkinase-Inhibitoren (Sorafenib, Cediranib, Axitinib, Pazopanib, Telatinib, Vandetanib) bei Patienten mit verschiedenen Tumoren [138,156-161]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um einen Klasseneffekt handelt und die Konzentrationsveränderung der löslichen Rezeptoren auf die Tyrosinkinase-Inhibition zurückzuführen ist.

Allerdings ist bisher nur wenig über den zugrunde liegenden Mechanismus bekannt. Zur Erklärung der abfallenden sVEGFR-2-Konzentrationen wird ein möglicher Feedback-Mechanismus postuliert. Bei Mäusen wurde beobachtet, dass es nach

Sunitinibapplikation ausgehend von steigenden VEGF-A-Konzentrationen in mehreren Organen (Leber, Herz, Milz, Niere, Knochenmark und Haut) [162] zu einer Downregulation von VEGFR-2 an der Zelloberfläche kam, die anschließend zu verminderten sVEGFR-2-Konzentrationen im Plasma der Mäuse führte. Zudem wurden bei Mäusen, die VEGF-A überexprimierten, auch ohne die Gabe von Sunitinib niedrigere sVEGFR-2-Plasmakonzentrationen beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht (nur) Sunitinib direkt zu einer Veränderung der sVEGFR-2-Konzentrationen führt, sondern diese auch allein durch steigende VEGF-A-Konzentrationen bedingt sein kann [163]. Fallende Konzentrationen an ungebundenem, aktivem VEGF-A, die unter der Therapie mit Bevacizumab, einem monoklonalen anti-VEGF-A-Antikörper, trotz steigender Gesamtkonzentrationen beobachtet wurden, führten nicht zu einer Veränderung der sVEGFR-2-Plasmakonzentrationen [164]. Der beobachtete Wiederanstieg der sVEGFR-2-Konzentrationen konnte zumindest *in vitro* für die zellgebundenen Rezeptoren nachgewiesen werden. Dort zeigte sich, dass die Expression von VEGFR-2 an der Zelloberfläche etwa 24 h, nachdem VEGF-A aus dem Zellkulturmedium entfernt worden war, erneut zunahm [163]. Eine häufig verwendete Erklärung für die zunehmende VEGF-A-Konzentration ist eine durch Sunitinib induzierte Hypoxie, die zu einem Anstieg der VEGF-A-Konzentration führt [19,68,69,71-73,165,166]. Allerdings konnte bei Mäusen weder in der Milz noch in der Leber, im Herz oder in der Niere eine erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$  [162], einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren von VEGF-A [6], festgestellt werden. Zudem ist auch die Herkunft beider löslichen Rezeptoren bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt, wobei verschiedene Spleiß-Varianten oder die Abspaltung der Rezeptoren von der Zelloberfläche mögliche Wege sind [152,162,163].

Obwohl die Veränderung der Biomarkerkonzentrationen nach Beginn der Sunitinibtherapie auch bei Gesunden zu beobachten war [97], gibt es Hinweise, dass auch der Tumor in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielt [163]. Der Einfluss des Tumors kann je nach Entität und Ausdehnung individuell sehr unterschiedlich sein und somit eine Begründung für die beobachtete hohe Variabilität der Basiskonzentrationen von sVEGFR-2 und sVEGFR-3 der Patienten im Vergleich zu denen der gesunden Probanden sein (Tab. 5.1). Im Gegensatz zu sVEGFR-3, für den deutlich höhere mediane Plasmakonzentrationen bei Patienten mit metastasierendem Leber- und Nierenzellkarzinom oder metastasierendem malignem Melanom im Vergleich zu den anderen Probanden beobachtet wurden, unterscheiden sich die

medianen Basiskonzentrationen von sVEGFR-2 nur geringfügig zwischen den verschiedenen Populationen (Tab. 5.1) [19,69,70,72-74,99,152,157-160,167-170]. Bei vielen Tumorentitäten wurde eine erhöhte Expression von VEGFR-3 beobachtet [69,171-173]. Der VEGF-C/VEGFR-3-Weg scheint über das lymphatische System am Prozess der Metastasierung beteiligt zu sein [174]. Diese Zusammenhänge können eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede in den Basiskonzentrationen, der hohen Variabilität verglichen mit Gesunden und für das unterschiedlich starke Ansprechen von sVEGFR-3 auf Sunitinib in Abhängigkeit von der Tumorentität sein.

Tab. 5.1 Mediane Plasmakonzentrationen (Spanne) von sVEGFR-2 und sVEGFR-3 bei Probanden und Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten

Population	Mediane Plasmakonzentration [ng/mL] (Spanne)	
	sVEGFR-2	sVEGFR-3
Gesunde Probanden	8,7 (7,2 - 11,6)	20,3 (11,5 - 32,1)
	8,3 <sup>†</sup> (5,3 - 10,0) <sup>a</sup>	22,9 (0,2 - 33,2) <sup>*c</sup>
	6,8 (3,5 - 11,3) <sup>b</sup>	
mCRC-Patienten	9,4 (5,7 - 13,5)	17,5 (8,4 - 83,1)
	10,3 <sup>†</sup> ± 0,3 <sup>+‡d</sup>	—
mRCC-Patienten	9,6 (6,4 - 14,5) <sup>e</sup>	70,7 (23,3 - 129,2) <sup>f</sup>
	9,7 <sup>†</sup> (6,5 - 14,7) <sup>‡f</sup>	47,0 <sup>‡#</sup>
	11,7 <sup>†g</sup>	
mHCC-Patienten	7,1 (4,6 - 13,7) <sup>i</sup>	48,7 (12,4 - 119,3) <sup>i</sup>
	8,7 <sup>†</sup> (8,3 - 9,0) <sup>~j‡</sup>	44,8 <sup>†</sup> (40,8 - 48,8) <sup>~j‡</sup>
RC-Patienten	15,5 (11,5 - 18,0) <sup>k</sup>	
mMM-Patienten	—	39,1 (18,5 - 49,5) <sup>*c</sup>
GIST-Patienten	8,4 (5,8 - 14,2) <sup>l</sup>	—
MC-Patienten	8,2 (IQR: 6,9 - 9,3) <sup>m</sup>	—
NSCLC-Patienten	12,6 <sup>n</sup>	—
	9,6 (4,1 - 16,7) <sup>o</sup>	
	8,0 (2,9 - 17,8) <sup>b</sup>	

m: metastasierend, CRC: Kolorektalkarzinom; RCC: Nierenzellkarzinom; HCC: Leberzellkarzinom; RC: Rektales Karzinom; MM: Malignes Melanom; GIST: Gastrointestinaler Stromatumor; MC: Müllerscher Misch tumor; NSCLC: Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; IQR: Interquartilsabstand; #Bevacizumab-resistent; \*Serumkonzentration; <sup>†</sup>Mittelwert; <sup>+</sup>Standardabweichung; <sup>‡</sup>aus Grafik entnommen; <sup>~</sup>95 %-KI; <sup>a</sup>[152]; <sup>b</sup>[170]; <sup>c</sup>[99]; <sup>d</sup>[168]; <sup>e</sup>[19]; <sup>f</sup>[72]; <sup>g</sup>[74]; <sup>h</sup>[160]; <sup>i</sup>[69]; <sup>j</sup>[158]; <sup>k</sup>[169]; <sup>l</sup>[73]; <sup>m</sup>[167]; <sup>n</sup>[159]; <sup>o</sup>[157]; — keine Daten verfügbar

Mit Ausnahme der Probanden und der mHCC-Patienten, die verglichen mit sVEGFR-2 eine stärkere Abnahme der sVEGFR-3-Plasmakonzentration zeigten [69], ist die Reaktion beider Biomarker bei Patienten mit verschiedenen Tumoren vergleichbar (Tab. 5.2) [19,67,68,70,72-75,175]. Die Vermutung, dass beide Biomarker einen vergleichbaren Informationsgehalt aufweisen, ließ sich auch durch die Korrelationsanalyse sowohl der absoluten als auch der relativen Konzentrationen beider Rezeptoren bei Probanden und bei mCRC-Patienten stützen. Vergleiche zwischen Patienten mit gleicher Tumorentität (mCRC) und verschiedenen Dosierungen (37,5 versus 50 mg/Tag) und Patienten mit gleicher Sunitinibdosierung (50 mg) und unterschiedlichen Tumortypen (mCRC, mRCC, mHCC, mBC, GIST, mNET) deuten darauf hin, dass das Ausmaß der Biomarkerantwort sowohl dosis- als auch tumortypabhängig ist (Tab. 5.2).

Tab. 5.2 Mittlere maximale Veränderung der Plasmakonzentration von sVEGFR-2 und sVEGFR-3 relativ zum Basiswert nach vierwöchiger Therapie mit Sunitinib

Population	Plasmakonzentration relativ zum Basiswert, %		Dosis [mg]
	sVEGFR-2	sVEGFR-3	
Probanden	84 ± 8 <sup>†</sup>	68 ± 24 <sup>††</sup>	50
mCRC-Patienten	65 ± 13 <sup>†</sup>	63 ± 19 <sup>†</sup>	37,5
	45,2 <sup>a</sup>	40,5 <sup>a</sup>	50
mRCC-Patienten	< 70 (in 91 %) <sup>b</sup>	≤ 70 (in 87 %) <sup>b</sup>	50
	56 <sup>c‡</sup>	—	50
	48 <sup>d‡</sup>	—	50
	—	62,4 <sup>e#</sup>	50
mHCC-Patienten	45,6 <sup>f</sup>	21,9 <sup>f</sup>	50
mBC-Patienten	≤ 70 (in 88 %) <sup>g</sup>	≤ 70 (in 82 %) <sup>g</sup>	50
GIST-Patienten	58,8 <sup>h</sup>	—	25 – 75 <sup>*</sup>
mNET-Patienten	< 70 (in 60 %) <sup>i</sup>	< 70 (in 70 %) <sup>i</sup>	50

m: metastasierend, CRC: Kolorektalkarzinom; RCC: Nierenzellkarzinom; HCC: Leberzellkarzinom; BC: Mammakarzinom; GIST: Gastrointestinaler Stromatumor; NET: Neuroendokriner Tumor; <sup>\*</sup>Standardabweichung; <sup>†</sup>an Tag 6 nach 5 Tagen tgl. Sunitinib; <sup>‡</sup>aus Grafik entnommen; <sup>#</sup>Bevacizumab-resistent; <sup>\*</sup>25, 50 oder 75 mg bei einem 4/2- oder 2/2-Therapieschema; <sup>a</sup>[75]; <sup>b</sup>[19]; <sup>c</sup>[72]; <sup>d</sup>[70]; <sup>e</sup>[74]; <sup>f</sup>[69]; <sup>g</sup>[67]; <sup>h</sup>[68,73]; <sup>i</sup>[175]; — keine Daten verfügbar

Die PK/PD-Modelle gaben den zentralen Verlauf und die beobachtete Variabilität der Konzentrations-Zeit-Profile für sVEGFR-2 und sVEGFR-3 gut wieder. Für den löslichen Rezeptor 2 wurde eine *Interoccasion*-Variabilität auf den Basiswert in das PK/PD-Modell integriert, um der nach Therapieende nicht in jedem Fall wieder erreichten Basiskonzentration gerecht zu werden. Ähnliche Beobachtungen konnten zuvor veröffentlichten Studien an Krebspatienten unter einer Therapie mit Sunitinib entnommen werden [19,67,69,70,72,73].

Die berechneten Plasmahalbwertszeiten von sVEGFR-2 und sVEGFR-3 sind mit jeweils 5,7 und 6 Tagen untereinander vergleichbar und liegen in der gleichen Größenordnung wie die entsprechender rekombinanter Fusionsproteine. Aflibercept, ein vollhumaner, löslicher Rezeptor bestehend aus einer Domäne von VEGFR-1 und VEGFR-2 und der Fc-Region eines humanen Immunglobulins, weist nach intravenöser Applikation dosisabhängig eine Halbwertszeit zwischen 2 und 7 Tagen auf [176,177]. Eine Halbwertszeit von etwa einer Woche wurde für das humane lösliche VEGFR-3-Fc-Protein nach Adeno-vermitteltem virusgesteuerten Gentransfer in Mäusen berichtet [178].

Die Ursache für die hohe Variabilität insbesondere von sVEGFR-3, die sowohl bei Probanden als auch bei Patienten beobachtet (Tab. 5.1) und im Modell als interindividuelle Variabilität der Basiskonzentration und der intrinsischen Aktivität berücksichtigt worden ist, kann aufgrund des kleinen Patientenkollektivs nicht geklärt werden. Studien mit großen Patientenzahlen (> 50 · 100) sind notwendig, um individuelle Einflussfaktoren (Kovariaten) zu untersuchen, mit deren Hilfe allgemeingültige Aussagen getroffen werden können [116].

## 5.5 Überlebenszeitanalysen

Das primäre Ziel einer Krebstherapie ist die Heilung der Erkrankung. Da diese jedoch oft nicht mehr erreicht werden kann, wird häufig auch eine Lebensverlängerung mit akzeptablen unerwünschten Wirkungen als klinischer Erfolg gewertet. Zweitlinien-Therapien, das Wechseln eines Patienten in einen anderen Studienarm oder hohe Kosten durch größere Studien mit längeren Beobachtungszeiten erschweren die Interpretation der Gesamtüberlebenszeit als primären Endpunkt. Metaanalysen haben gezeigt, dass sowohl das progressionsfreie Überleben (PFS) als auch die Zeit bis zur Progression (TTP) gute Surrogatendpunkte für das Gesamtüberleben (OS) in der Erstlinien-Therapie sind [179-181]. Die Verwendung der TTP ist daher zur Beurteilung

der Wirksamkeit von Sunitinib bei Patienten mit mCRC ein geeigneter, patientenrelevanter Endpunkt.

In der Literatur werden verschiedene Einflussfaktoren als Prädiktoren für die Zeit bis zur Progression oder das Gesamtüberleben diskutiert. Dazu gehört auch das Alter [182-187], das ausgehend vom Ergebnis der uni- und multivariaten Cox-Regression positiv prädiktiv für die TTP bei den Patienten der C-II-005-Studie zu sein schien. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine zusammengefasste Analyse von neun Phase III-Studien, in der das PFS bei jüngeren Patienten (< 50 Jahre) geringfügig schlechter war (HR: 1,10,  $p = 0,02$ ,  $n = 6284$ ). Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht für Patienten unter 40 Jahren im Vergleich zu älteren reproduziert werden ( $p = 0,54$ ) [182]. In einer bevölkerungsbasierten Kohortenstudie an Patienten mit CRC des Krebsregisters Rostock wurde dagegen beobachtet, dass Patienten mit höherem Lebensalter ( $\geq 75$  Jahre) eine signifikant schlechtere Prognose als Patienten unter 60 Jahren aufwiesen (HR: 2,5,  $p < 0,001$ ,  $n = 6016$ ) [184]. Andere Untersuchungen fanden wiederum keinen Einfluss des Alters auf das Überleben bei Patienten mit CRC [188,189]. Die Auswertung des nationalen SEER-Krebsregisters (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) zwischen 1991 und 1999 zeigte bei Patienten mit Rektumkarzinom keinen Altersunterschied hinsichtlich der tumorspezifischen 5-Jahres-Überlebensrate ( $n = 11\,778$ ) [187]. Für Patienten mit Kolonkarzinom hingegen war die Prognose für junge Patienten (20 - 40 Jahre) signifikant schlechter ( $p = 0,015$ ,  $n = 47.791$ ) [186]. Unter Berücksichtigung der Patienten- und Tumorcharakteristika wurde allerdings für beide Tumorarten ein signifikanter Überlebensvorteil für die jüngeren Patienten identifiziert (Rektum: HR: 0,70,  $p = 0,0004$ ; Kolon: HR: 0,63,  $p < 0,0001$ ) [186,187]. Da die Inzidenz des Kolorektalkarzinoms mit zunehmendem Alter steigt und nur wenige Patienten unter 40 - 50 Jahren erkranken [190] (siehe Abb. 1.5), ist diese Patientengruppe in klinischen Studien in der Regel unterrepräsentiert [182]. Das kann eine der Ursachen für die heterogene Datenlage sein. Zudem wird das Kolorektalkarzinom bei Patienten, die jünger als 50 Jahre sind, in der Regel erst in späteren und weniger differenzierten Stadien diagnostiziert, was auf die ab 50 Jahren routinemäßig eingesetzten Screeningverfahren zurückgeführt werden kann [183]. Das erklärt auch den unter Berücksichtigung des Tumorstadiums negativen prädiktiven Effekt des steigenden Alters auf das Überleben bei Patienten mit Rektum- und Kolonkarzinom [186,187]. Der allgemein schlechtere Gesundheitszustand im Alter sowie die limitierte Lebenszeit eines Menschen könnten dagegen Gründe für eine (tumorunabhängige) schlechtere Prognose bei älteren Patienten sein. Die heterogenen Ergebnisse früherer Untersuchungen und die Vielzahl möglicher Störfaktoren deuten

somit darauf hin, dass das Alter eine eher untergeordnete Rolle als Prädiktor spielt. Die Aussagekraft (Power) einer Studie eine schwache Kovariate zu finden, wird von einer Simulationsstudie bei einer geringen Fallzahl (~20) auf etwa 10 % geschätzt [116].

Die individuelle Pharmakokinetik von Sunitinib war ein weiterer möglicher Prädiktor für die TTP. So wiesen sowohl in der multivariaten Cox-Regression als auch mit dem modellbasierten Ansatz die  $AUC_{ss}$  bzw. die  $AC_{ub}$  signifikante prädiktive Eigenschaften auf. Demnach ist eine höhere Exposition mit einer längeren progressionsfreien Zeit assoziiert. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Untersuchung an 443 GIST- und mRCC-Patienten und Patienten mit anderen soliden Tumoren, in der die  $AUC_{ss}$  sowohl mit einer signifikant längeren TTP und OS bei allen untersuchten Tumortypen verbunden war als auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines Therapieansprechens bei mRCC-Patienten [128]. Die HR eines mRCC-Patienten mit der höchsten in dieser Studie beobachteten  $AUC_{ss}$  von 1,49 mg·h/L verglichen mit einem mit der niedrigsten (0,64 mg·h/L) liegt demnach bei 0,34 und die eines GIST-Patienten bei 0,42 [128]. Für mCRC-Patienten gleichen Alters ergibt sich eine HR von 0,032 für den Patienten mit höchster verglichen mit dem Patienten mit niedrigster  $AUC_{ss}$  in dieser Studie. Der Effekt scheint damit zwar größer zu sein, wird jedoch aufgrund der geringen Datenmenge mit schlechter Präzision abgeschätzt. Im Allgemeinen wird empfohlen, dass die Anzahl der prädiktiven Kovariaten im Modell nicht größer sein soll als 10 % des Datenumfangs der kleineren Gruppe (bei Teilung der Daten) bzw. der nicht-zensierten Daten. Damit kann vermieden werden, dass die  $H_0$ -Hypothese fälschlicherweise verworfen und ein falscher Effekt angenommen wird (Typ I), wichtige Effekte hingegen nicht gefunden werden können (Typ II) oder es zu Über- bzw. Unteranpassungen kommt (Typ III) [136,191,192]. Die Ergebnisse der Cox-Regression deuten auf derartige Fehler hin. Sowohl der Einfluss des Alters als auch der der  $AUC_{ss}$  schienen im Vergleich zu Ergebnissen aus der Literatur überschätzt zu werden. Allerdings zeigte auch die parametrische Überlebensanalyse mit Hilfe eines *Time-to-Event*-Modells einen signifikanten Effekt der individuellen Pharmakokinetik auf die TTP. Stärker prädiktiv als die  $AUC_{ss}$  war in dem Fall die ungebundene, aktive Konzentration, die nur in dem modellbasierten Ansatz untersucht werden konnte, der die Integration des gesamten Konzentrations-Zeit-Profiles ermöglichte. Der Einschluss von nur einer Kovariate in das *Time-to-Event*-Modell und die präzise Abschätzung der Modellparameter bestätigen jedoch die Güte des Modells. Trotz der geringen Datenmenge eignet sich das Modell daher durchaus zur Hypothesengenerierung möglicher prädiktiver Kovariaten [116].

Obwohl die Veränderungen der Biomarkerkonzentrationen nach der Applikation von Sunitinib darauf hindeuten, dass diese in direktem Zusammenhang zur Hemmung der VEGF-Rezeptorsignalisierung stehen, scheint weder der lösliche Rezeptor 2 noch 3 prädiktiv für die TTP bei den mCRC-Patienten zu sein. Auch andere Studien bei Patienten mit verschiedenen Tumortypen kamen zu unterschiedlichen Einschätzungen hinsichtlich der prädiktiven Eigenschaften der beiden Biomarker. Eine stärkere Reduktion der sVEGFR-2-Plasmakonzentrationen scheint demnach mit einer stärkeren Reduktion der Tumorgröße bei mBC-Patienten [68], mit längerem PFS und OS bei mNET- bzw. mHCC-Patienten [69,175] und mit einem Therapieansprechen bei Patienten mit mRCC [68] assoziiert zu sein. SVEGFR-3 wurde hingegen in mehreren Untersuchungen als prädiktiver Biomarker identifiziert. Eine im Vergleich stärkere Reduktion relativ zum Basiswert wurde bei Patienten mit längerem OS (mBC) [67], mit einem objektiven Therapieansprechen (mRCC) [19], stärkerer Reduktion der Tumordichte (mHCC) [69], verminderter Tumorlast (mM) [99] und einem längeren OS bzw. einer stärkeren Reduktion der Tumorgröße und einer partiellen Remission (mNET) [68,175] beobachtet. Niedrigere Basiskonzentrationen von sVEGFR-3 traten zudem bei Patienten mit längerem PFS (mRCC) [74] und mit einem Therapieansprechen (mM) [99] auf, waren jedoch höher bei mNET-Patienten mit längerem PFS [68]. Eine parametrische modellbasierte Analyse bei GIST-Patienten identifizierte sVEGFR-3 als einen prädiktiven Faktor für das Gesamtüberleben [193]. Die Tumorgenese, -angiogenese und -progression basieren auf dem Zusammenspiel multipler Mechanismen, zu denen auch der VEGF-Weg gehört. Diese Komplexität und die Beteiligung mehrerer Organe [162] sind mögliche Erklärungen für die gegensätzlichen Ergebnisse, die in der Literatur zu finden sind. Der Tumortyp, das Expressionsmuster entsprechender Tyrosinkinase, mögliche Polymorphismen sowie Resistenz, die intrinsisch oder während der Therapie entstehen kann und durch alternative proangiogene Wege und Hochregulation entsprechender Faktoren gekennzeichnet ist [194], sorgen für eine hohe intra- und intertumorale sowie für eine hohe interindividuelle Variabilität. Die löslichen Rezeptoren erklären dabei nur einen Teil [64], der abhängig vom Tumortyp und vom Resistenzstatus verschieden stark gewichtet sein kann. Als alleinige Prädiktoren erscheinen sie wenig geeignet zu sein. Die Pharmakokinetik hingegen repräsentiert die Exposition von Sunitinib und SU12662, die letztendlich zur Hemmung verschiedener Wege, die Einfluss auf die Tumorangio- und -progression haben, führt. Trotz der geringen Datenlage kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Pharmakokinetik, obwohl die löslichen Rezeptoren als pharmakodynamische Marker näher am Effekt sind, bei den mCRC-



Patienten prädiktiver zu sein scheint [116]. Untersuchungen mit Patientenzahlen über 100 bis 300 sind allerdings nötig, um auch mittelstarke und schwache Effekte mit einer Power von etwa 80 % finden zu können [116].

Frühere große Studien belegten die Wirksamkeit von FOLFIRI bei Patienten mit mCRC [195,196]. Dieses Therapieregime gehört daher zur standardmäßig angewendeten Erst- und Zweitlinientherapie bei dieser Indikation [56]. Der Einfluss der Komedikation, die erheblich zum antiproliferativen Effekt beiträgt, wurde in der Analyse aufgrund fehlender Informationen nicht berücksichtigt. Zudem gibt es Hinweise, dass Sunitinib bei mCRC-Patienten nur wenig Wirksamkeit zeigt. Da es sich bei der C-II-005-Studie um eine explorative, nicht-randomisierte Studie ohne Kontrollgruppe handelt, können anhand der vorliegenden Ergebnisse keine validen Aussagen zur Wirksamkeit von Sunitinib in Kombination mit FOLFIRI bei mCRC-Patienten gemacht werden [197]. In der Literatur sind jedoch bereits Ergebnisse zum PFS bei mCRC-Patienten zu finden. Dabei handelt es sich um Studien, in denen sowohl mit Sunitinib in Kombination mit FOLFIRI und mit FOLFIRI allein (NCT00457691) oder einarmig mit Sunitinib in Kombination mit FOLFIRI (NCT00668863) als auch mit Sunitinib als Monotherapie behandelt worden ist [75,198,199]. Die Dosierungen und Applikationsschemata waren bei allen aufgeführten Studien identisch mit dem der C-II-005-Studie (Tab. 5.3).

Tab. 5.3 Progressionsfreies Überleben (PFS) bei Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom aus verschiedenen Studien und Therapien

Studie	Therapie	Medianes PFS (95 % KI) [Monate]
C-II-005	FOLFIRI + Sunitinib	11,1 (8,3 - nb <sup>1</sup> ).
Van Cutsem et al. <sup>a</sup>	FOLFIRI	8,0 (7,6 - 9,0)
NCT004 57691 <sup>b</sup>	FOLFIRI + Sunitinib	7,8 (7,1 - 8,4)
	FOLFIRI	8,4 (7,6 - 9,2)
Tsuji et al. 2012 <sup>c</sup>	FOLFIRI + Sunitinib	6,7 (4,7 - 9,2)
Saltz et al. 2007 <sup>d</sup>	Sunitinib	2,5 (2,3 - 3,1)

<sup>1</sup>aufgrund der zensierten Daten nicht berechenbar; <sup>a</sup>[200]; <sup>b</sup>noch nicht veröffentlichte Studie, Daten stammen von clinicaltrials.gov; <sup>c</sup>[198]; <sup>d</sup>[75]; KI: Konfidenzintervall; FOLFIRI: Folinat, Fluorouracil, Irinotecan

Im Vergleich zu den beiden anderen Studien, die eine Kombination mit FOLFIRI untersuchten, wird das PFS für die Patienten der C-II-005-Studie im Median etwas höher abgeschätzt. Das verhältnismäßig große Konfidenzintervall mit fehlender

Abschätzung der oberen Grenze kann auf die hohe Anzahl zensierter und damit wenig informativer Daten (10 von 21) zurückgeführt werden. Ein Vergleich der Kaplan-Meier-Kurve mit der von Van Cutsem et al. veröffentlichten FOLFIRI-Kontrollgruppe [200] kann zur Hypothesengenerierung herangezogen werden (Abb. 5.1).

Das PFS scheint demnach durch eine Kombination mit Sunitinib leicht verlängert zu sein. Allerdings liegen die Werte der Kontrollgruppe teilweise innerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls der Überlebenskurve der zusätzlich mit Sunitinib behandelten Patienten. Beide Studien unterscheiden sich jedoch stark hinsichtlich der Anzahl der eingeschlossenen Patienten (599 bei Van Cutsem et al. versus 21 in der C-II-005-Studie). Die Präzision des Studienergebnisses ist demnach in der C-II-005-Studie wesentlich geringer. Ein weiterer Unterschied beider Studien, die in den angesetzten Ein- und Ausschlusskriterien vergleichbar sind, war die Zeit zwischen den Bestimmungen des Tumorstatus. Eine Ursache für die schlechtere Prognose der historischen Kontrollgruppe kann die im Vergleich zur Interventionsgruppe häufiger durchgeführte Bestimmung des Tumorstatus und damit das frühere Erkennen einer Progression sein (8 versus 12 Wochen) [200].

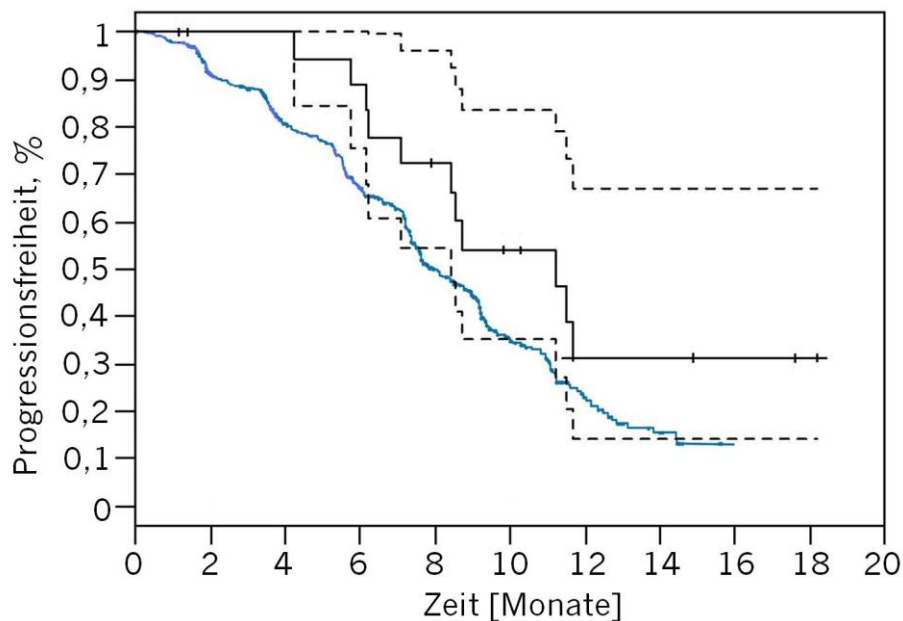


Abb. 5.1 Kaplan-Meier-Kurven für die mCRC-Patienten der C-II-005-Studie unter Therapie mit Sunitinib und FOLFIRI (—) mit 95 %-Konfidenzintervall (---) und der Kontrollgruppe aus Van Cutsem et al. [200] (FOLFIRI) (—).

mCRC: Metastasierendes Kolorektalkarzinom; FOLFIRI: Folinat, Fluorouracil, Irinotecan

Aufgrund der mangelnden Beobachtungs- und Strukturgleichheit ist es daher nicht auszuschließen, dass der Therapieerfolg einer zusätzlichen Sunitinibgabe bei diesem

Vergleich mit einer historischen Kontrollgruppe überschätzt wird. Die fehlende Vergleichbarkeit ist bereits in vielen nicht-randomisierten Studien mit historischen Kontrollgruppen beobachtet worden. Aus diesem Grund wird deren Verwendung kritisch betrachtet [201]. Ein häufiges Resultat war auch dort die Überschätzung des Therapieerfolges im Vergleich zu randomisierten, kontrollierten Studien (RCT) [197,201]. Eine entsprechende RCT konnte keinen Vorteil einer zusätzlichen Sunitinibgabe zeigen [199]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine Phase III-Studie mit 768 mCRC-Patienten (*SUN 1122*), die 2009 von der Firma Pfizer vorzeitig abgebrochen wurde, da keine signifikante Verlängerung des PFS erreicht werden konnte [202]. Die Vermutung, dass Sunitinib bei kolorektalem Karzinom nur wenig antitumorale Wirkung zeigt, wird letztlich auch durch die Ergebnisse einer Studie mit einer Sunitinibmonotherapie bestätigt [75]. Trotz eines berichteten Falls, in dem ein stark vorthrapierter mCRC-Patient von einer Sunitinibtherapie profitierte [203], scheint Sunitinib bei mCRC-Patienten nur bedingt Wirksamkeit zu zeigen. Aus diesem Grund und den fehlenden Informationen zur Pharmakokinetik der komedizierten Arzneistoffe können nur begrenzte Aussagen zum Ausmaß des Effektes gemacht werden. Zur Quali- und Quantifizierung des Effektes sind daher weitere Studien mit höherer Fallzahl, Kenntnis der individuellen Pharmakokinetik aller verabreichten antiproliferativ wirkenden Substanzen sowie eine Kombination aus Biomarkern, die verschiedene Wege der Tumorangio-genese und -progression widerspiegeln, essentiell.

## 5.6 Anwendungsmöglichkeiten

PK/PD- sowie Überlebenszeitmodelle können sämtliche klinische Szenarien simulieren. Somit können solche Modelle auch zur Dosisindividualisierung verwendet werden, sobald individuelle Faktoren Einfluss auf den betrachteten Endpunkt nehmen. Untersuchungen mit weniger als 50 - 100 Patienten dienen im Allgemeinen zur Hypothesengenerierung möglicher Kovariaten bzw. Prädiktoren. Höhere Fallzahlen sind nötig, um diese Hypothesen zu bestätigen und die Modelle für prädiktive Zwecke einzusetzen [116].

Ausgehend vom postulierten Zusammenhang zwischen der individuellen PK, beschrieben durch die Summe der ungebundenen Konzentrationen von Sunitinib und SU12662 wird davon ausgegangen, dass möglichst hohe Dosen gegeben werden müssen, um hohe Plasmakonzentrationen und damit einen bestmöglichen Effekt zu erzielen. Allerdings zeigten Untersuchungen bei Patienten mit GIST, mRCC und anderen soliden Tumoren auch einen Zusammenhang zwischen Exposition und

Toxizität. Demnach ist eine erhöhte Inzidenz eines Fatigue-Syndroms, eine steigende Wahrscheinlichkeit einen Fatigue-Grad 1 zu überschreiten, eine Neutropenie zu bekommen oder einen erhöhten diastolischen Blutdruck zu entwickeln mit steigender Sunitinibexposition assoziiert [128]. Auch innerhalb der C-II-005-Studie wurde eine dosislimitierende Toxizität (insbesondere hämatologische, dermatologische und gastrointestinale Toxizität) beobachtet, die auch für andere Tyrosinkinase-Inhibitoren in Kombinationstherapien beschrieben worden ist [46]. Die Überwachung der Plasmakonzentrationen scheint demnach sinnvoll zu sein, um bei möglichst hoher Verträglichkeit die bestmögliche Wirksamkeit zu erreichen. Ein Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) ist dabei im Allgemeinen bei folgenden Kriterien indiziert:

- hohe interindividuelle Variabilität bei geringer intraindividuelle Variabilität
- konsistenter Zusammenhang zwischen Konzentration und Wirksamkeit sowie zwischen Konzentration und Toxizität
- enge therapeutische Breite
- keine pharmakodynamische Marker für die Routinebestimmung [82,204]

Die Pharmakokinetik von Sunitinib weist eine moderate interindividuelle Variabilität auf (siehe Tab. 4.12) [43]. Der Tumortyp (kein Tumor, GIST, mRCC, andere solide Tumore), die asiatische Rasse, Geschlecht, Körpergewicht und ein erhöhter ECOG-Status wurden in einer populationspharmakokinetischen Untersuchung als Kovariaten identifiziert. Simulationen wiesen jedoch darauf hin, dass deren Einfluss auf die Sunitinib-Pharmakokinetik minimal ist [43]. Bei Probanden wurde allerdings eine hohe intraindividuelle Variabilität in der Absorptionsphase beobachtet (*Interoccasion-Variabilität* auf die mittlere Transitzeit (MTT)) [97]. Die Simulationsstudie zeigte, dass ein Teil der intraindividuellen Variabilität, die unter anderem im Restfehler wiederzufinden ist, durch die Kenntnis des Dosierungszeitpunktes erklärt werden kann. Dazu können beispielsweise MEMS<sup>®</sup>-Dosen (*Medication Event Monitoring System*) oder Tagebücher verwendet werden, in denen die Einnahmezeitpunkte aufgezeichnet bzw. vermerkt werden.

Der bestehende Zusammenhang der Plasmakonzentration bzw. der  $AUC_{ss}$  oder der  $AC_{ub}$  sowohl mit der Wirksamkeit als auch mit der Toxizität [128] kann ein TDM rechtfertigen, zumal Sunitinib hauptsächlich über CYP3A4 metabolisiert wird [44], das zwischen Individuen sehr variabel ist und ein hohes Interaktionspotential sowohl mit anderen Arzneimitteln als auch mit Lebensmitteln aufweist. Für Imatinib gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen bei Patienten mit GIST und chronischer myeloischer Leukämie, die einen Zusammenhang zwischen der Talkonzentration und dem klinischen Ansprechen berichten und bestätigen, dass ein TDM für Imatinib

sinnvoll ist [205-207]. Für Sunitinib und SU12662 liegen dagegen nur *in vitro* [208] und präklinische Daten [40,209] vor, in denen eine Zielkonzentration von > 50 bzw. 50 - 100 ng/mL zu einer ausreichenden Hemmung der Targets führte [40,208,209]. Zur Etablierung eines TDM für Sunitinib sind daher weitere Untersuchungen nötig. Der Tumortyp spielt dabei eine große Rolle und sollte bei der Quantifizierung des Zusammenhangs zwischen Konzentration und Wirksamkeit, aber auch zwischen Konzentration und Toxizität beachtet werden. Zudem sollten pharmakoökonomische Aspekte berücksichtigt und zusätzlich mögliche leicht zugängliche pharmakodynamische Marker, die für die Routinebestimmung geeignet sind, untersucht werden. Studien deuten darauf hin, dass das Auftreten einer Hypertonie positiv prädiktiv bei Patienten mit mRCC ist [210-212]. Unter der Therapie mit Axitinib erwies sich ein diastolischer Blutdruck  $\geq 90$  mmHg bei Patienten mit soliden Tumoren als positiver Prädiktor für das progressionsfreie Überleben, das Gesamtüberleben sowie für die Ansprechrate [213].

Sowohl für weitere Simulationsstudien als auch für die Anwendung des Modells im Rahmen eines TDM sollten Studien mit einer höheren Fallzahl durchgeführt werden, um die aufgestellte Hypothese zu bestätigen. Auf dem Weg zu einer Dosisindividualisierung von Sunitinib sollte die Hypertonie bzw. der diastolische Blutdruck als vielversprechender, leicht zugänglicher Biomarker weiter untersucht und der Zusammenhang zur Pharmakokinetik und dem Ansprechen quantifiziert werden. Im Falle eines TDM muss ein Zielwert eines pharmakokinetischen Parameters, wie z. B. eine Ziel-AUC oder Ziel-Konzentration im Steady-State, festgelegt werden, der sowohl die Wirksamkeit als auch die Toxizität (z. B. Fatigue) berücksichtigt.

Der methodische Ansatz mit Hilfe eines *Time-to-Event*-Modells den Zusammenhang zwischen Sunitinib-Exposition und Wirksamkeit/Outcome zu quantifizieren, kann trotz bestehender Limitationen als Ausgangspunkt für eine individualisierte Tumorthherapie mit Sunitinib dienen.



## 6. Schlussfolgerung und Ausblick

Das metastasierende Kolorektalkarzinom ist eine Krebserkrankung mit nur mäßiger Prognose und gehört zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland [48]. Es besteht daher ein großer Forschungsbedarf, prädiktive Marker zu identifizieren, die frühzeitig auf ein mögliches Therapieansprechen oder -versagen hinweisen.

Die Validierung analytischer Methoden zur Quantifizierung von Biomarkern in einer geeigneten biologischen Matrix anhand geltender Leitlinien ist ein wichtiger Schritt bei der Etablierung von Biomarkern. Trotzdem ist derzeit noch keine validierte Methode zur Bestimmung von sVEGFR-3, einem in der Literatur beschriebenen pharmakodynamischen Marker von Sunitinib [19], in menschlichem Plasma bekannt. In dieser Arbeit konnte erstmals ein Sandwich-ELISA validiert werden, der eine Selektivität, Parallelität, Präzision und Richtigkeit, Stabilität und Robustheit entsprechend der aktuellen Leitlinien der FDA und der EMA aufweist. In anschließenden Studien konnte die Anwendbarkeit sowohl an Probanden als auch an Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom gezeigt werden.

Da die Reduktion der Plasmakonzentrationen von sVEGFR-3 unter der Therapie mit Sunitinib auch bei anderen antiangiogenen Tyrosinkinase-Inhibitoren beobachtet wurde [138,156-161], kann dieser validierte Assay sowohl in zukünftigen sunitinibbasierten als auch in klinischen Studien mit anderen antiangiogenen Therapien mit verschiedenen Patientenkollektiven zur Quantifizierung von sVEGFR-3 angewendet werden. Für große klinische Studien ist die Automatisierung von Teilprozessen, wie z. B. der Probenverdünnung oder der Pipettiervorgänge, sinnvoll, da die Methodik und damit die Messung einer großen Anzahl an Studienproben relativ zeitintensiv sind.

Die durch Sunitinib induzierten Veränderungen der Plasmakonzentrationen der beiden löslichen VEGF-Rezeptoren 2 und 3 wurden mit Hilfe von PK/PD-Modellen auch für Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom quantifiziert. Beide Rezeptoren eignen sich daher als pharmakodynamische Marker bei Patienten unter einer Sunitinibtherapie. Da der Konzentrations-Zeit-Verlauf von sVEGFR-2 und sVEGFR-3 in Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom mit dem der zuvor untersuchten Probanden und Patienten mit anderen Tumorentitäten vergleichbar ist, diese sich allerdings teilweise im Ausmaß der Biomarkerantwort voneinander unterscheiden, sollten weitere Untersuchungen zum besseren Verständnis des Einflusses von Dosis und Tumortyp durchgeführt werden. Dabei sollten für jede Tumorentität verschiedene

Dosisstufen berücksichtigt werden, um die Entwicklung mechanistischer Modelle zu ermöglichen. Simulationen mit diesen PK/PD-Modellen können anschließend für die Identifizierung neuer Arzneistoffkandidaten mit antiangiogenen Eigenschaften und die Dosisfindung dieser Substanzen in allen Phasen der klinischen Prüfung eingesetzt werden. Die Untersuchung und Integration von patienten-, tumor- und substanzspezifischen Einflussfaktoren in die Modelle erlauben zudem eine Individualisierung der antiangiogenen Tumortherapie.

VEGF-A sollte hingegen aus analytischen Gründen als Biomarker nicht weiter untersucht werden, da Ergebnisse zwischen Studienzentren nur schwierig zu vergleichen sind.

Die nichtlineare Modellierung unter Berücksichtigung gemischter Effekte gewinnt immer mehr an Bedeutung für die Analyse von Überlebenszeiten. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte *Time-to-Event*-Modell für Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom berücksichtigt die individuelle Pharmakokinetik als positiven Prädiktor für die Zeit bis zur Progression. Da die Daten aus einer kleinen Studie stammen, konnten diese nur empirisch beschrieben werden. Komplexe Zusammenhänge und Verteilungen wurden dabei jedoch nicht berücksichtigt. Aufgrund der fehlenden oder nur schwachen prädiktiven Eigenschaften der Konzentrationen der beiden löslichen Rezeptoren, die auch in der Literatur kontrovers diskutiert werden, sowie der auftretenden angiogenen Resistenz im VEGF-Weg sollten in Zukunft weniger einzelne Biomarker, sondern Kombinationen aus Markern, die verschiedene Wege der Angiogenese beschreiben, untersucht werden.

Die hohe Toxizität der Kombinationstherapie aus Sunitinib und FOLFIRI, die in dieser Studie von den behandelnden Ärzten beobachtet, aber auch zuvor für verschiedene Tyrosinkinase-Inhibitoren in Kombinationstherapien beschrieben worden ist [46], erfordert die Erforschung zugrunde liegender Mechanismen. Dazu gehört auch das bessere Verständnis der Kanzerogenese und der Rolle der Angiogenese, das unter anderem die deutlichen Unterschiede in Wirksamkeit, Kombinierbarkeit und Toxizität beim Kolorektalkarzinom zwischen der Anti-VEGF-Therapie (Bevacizumab) und der Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren beantworten kann. Weitere Studien oder Behandlungen mit einer Kombination aus FOLFIRI und Sunitinib erscheinen wegen mangelnder Wirksamkeit und hoher Toxizität nicht gerechtfertigt zu sein.

Ansätze des Überlebensmodells können jedoch durchaus als Grundlage für die Entwicklung von *Time-to-Event*-Modellen in anderen Indikationen verwendet werden, die anschließend sowohl für Simulationen klinischer Szenarien als auch zur Identifizierung profitierender Patienten herangezogen werden können.



## 7. Zusammenfassung

Im Rahmen der Dissertation wurde die Analytik und Eignung von Biomarkern (sVEGFR-2 und sVEGFR-3) zur Vorhersage der Wirksamkeit von Sunitinib mit Hilfe der PK/PD-Modellierung in einer multizentrischen Studie bei Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom untersucht.

Zunächst wurde ein ELISA zur Quantifizierung des löslichen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors 3 in humanem Plasma nach den anerkannten Leitlinien der EMA und der FDA sowie weiterer spezieller Empfehlungen für Immunoassays erfolgreich validiert. In einer Probandenstudie mit Sunitinib konnte auch die Eignung des Assays zur Messung klinischer Studienproben nachgewiesen werden. Untersuchungen zur präanalytischen Probenaufbereitung, die in den Studienzentren lokalisiert und damit schwierig zu kontrollieren war, zeigten, dass die Quantifizierung von sVEGFR-3 und auch sVEGFR-2 robust ist. Die gemessenen Plasmakonzentrationen von VEGF-A waren hingegen stark abhängig von der gewählten relativen Zentrifugalbeschleunigung während der Gewinnung des Plasmas. Demnach ist ein Vergleich der absoluten Konzentrationen von VEGF-A zwischen verschiedenen Zentren und damit auch zwischen verschiedenen Studien kritisch zu beurteilen und schränkt die Eignung von VEGF-A als Biomarker verglichen mit den beiden löslichen Rezeptoren deutlich ein.

Grundlage für die anschließende PK/PD-Modellierung waren Modelle, die zuvor für Probanden entwickelt worden waren [97]. Die Pharmakokinetik von Sunitinib und seinem aktiven Metaboliten SU12662 der 21 mCRC-Patienten, die in der C-II-005-Studie mit Sunitinib in Kombination mit FOLFIRI behandelt worden waren, konnte nach dem Hinzufügen eines peripheren Kompartiments auch für den aktiven Metaboliten gut beschrieben werden. Zwischen den Studienzentren wurden starke Unterschiede in der Biomarkerreaktion von VEGF-A beobachtet, sodass eine anschließende PK/PD-Auswertung nicht möglich war. Analog zu Beobachtungen früherer Untersuchungen bei Patienten mit verschiedenen Tumoren, aber auch bei Probanden fielen die Konzentrationen der löslichen Rezeptoren zeitverzögert nach Therapiebeginn ab. Nach Therapieende erreichten sie wieder annähernd die jeweiligen Basiskonzentrationen. Der Konzentrations-Zeit-Verlauf der beiden löslichen Rezeptoren wurde mit einem indirekten Responsemodell gut beschrieben.

Anschließende Überlebenszeitanalysen konnten jedoch keinen der untersuchten Biomarker als Prädiktor bei den mCRC-Patienten innerhalb der C-II-005-Studie

identifizieren. Die individuelle Pharmakokinetik scheint hingegen prädiktiv für die Zeit bis zur Progression zu sein. In einer multivariaten Cox-Regression erwiesen sich sowohl das Alter als auch die Steady-State-AUC der ungebundenen, aktiven Substanz als positive Prädiktoren. Die heterogenen Ergebnisse aus der Literatur und mögliche Störfaktoren, wie das Tumorstadium, die mit dem Alter in Verbindung stehen, deuten darauf hin, dass der Einfluss des Alters eine eher untergeordnete Rolle spielt. In einer parametrischen, modellbasierten Überlebenszeitanalyse, in die gesamte Konzentrations-Zeit-Profile von Sunitinib und seines Metaboliten, aber auch der Biomarker integriert werden können, wurde die Zeit bis zur Progression am besten mit Hilfe der momentanen Plasmakonzentration der ungebundenen, aktiven Substanzen (Sunitinib und SU12662) vorhergesagt. So konnte in einem sequentiellen Ansatz ein *Time-to-Event*-Modell entwickelt werden, das in Abhängigkeit von der momentanen Plasmakonzentration von Sunitinib und SU12662 die Wahrscheinlichkeit einer Progression vorhersagen kann.

Das Ergebnis dieser Arbeit ist die Validierung einer analytischen Methode zur Quantifizierung von sVEGFR-3, die es erlaubt, das Testsystem, seine Leistungsfähigkeit und die optimalen Bedingungen, die eine Reproduzierbarkeit und hinreichende Richtigkeit sicherstellen, zu beurteilen. Während der klinischen Qualifizierung wurden PK- und PK/PD-Modelle zur Beschreibung der Konzentrations-Zeit-Profile von Sunitinib und den beiden Biomarkern entwickelt und die Verknüpfung zwischen individuellen pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern und einem klinischen Endpunkt vorgenommen. Die Pharmakokinetik bei Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom scheint demnach eher als Prädiktor für die Zeit bis zur Progression geeignet zu sein als die untersuchten Biomarkerkonzentrationen.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386:671-4
- [2] Mross, K. Angiogeneseinhibition in der Onkologie. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2007
- [3] Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280:C1358-66
- [4] Harper, J. and Moses, M.A. Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications. *Experientia*. 2006:223-68
- [5] Kerbel, R.S. Tumor angiogenesis. *N.Engl.J.Med*. 2008; 358:2039-49
- [6] Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med*. 2003; 9:669-76
- [7] Mross, K. Inhibition des VEGF-Rezeptorsystems mit Tyrosinkinase-Inhibitoren. *pharmuz*. 2008; 37:404-15
- [8] Karpanen, T. and Alitalo, K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu.Rev.Pathol*. 2008; 3:367-97
- [9] Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983; 219:983-5
- [10] Hicklin, D.J. and Ellis, L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J.Clin.Oncol*. 2005; 23:1011-27
- [11] Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380:435-9
- [12] Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor. *Eur.J.Cancer*. 1996; 32A:2413-22
- [13] Veikkola, T. and Alitalo, K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin.Cancer Biol*. 1999; 9:211-20
- [14] Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat.Rev.Drug Discov*. 2007; 6:273-86
- [15] Shibuya, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem.Mol.Biol*. 2006; 39:469-78
- [16] Hornig, C. and Weich, H.A. Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis*. 1999; 3:33-9
- [17] Shibuya, M. and Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp.Cell Res*. 2006; 312:549-60
- [18] Debrah, A.Y., Mand, S., Specht, S., Marfo-Debrekyei, Y., Batsa, L., Pfarr, K. et al. Doxycycline reduces plasma VEGF-C/sVEGFR-3 and improves pathology in lymphatic filariasis. *PLoS.Pathog*. 2006; 2:829-43

- [19] Deprimo, S., Bello, C., Smeraglia, J., Baum, C., Spinella, D., Rini, B. et al. Circulating protein biomarkers of pharmacodynamic activity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: modulation of VEGF and VEGF-related proteins. *J.Transl.Med.* 2007; 5:32-42
- [20] Ebos, J.M.L., Bocci, G., Man, S., Thorpe, P.E., Hicklin, D.J., Zhou, D. et al. A Naturally Occurring Soluble Form of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Detected in Mouse and Human Plasma. *Mol.Cancer Res.* 2004; 2:315-326
- [21] Kendall, R.L. and Thomas, K.A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1993; 90:10705-9
- [22] Levine, R.J., Maynard, S.E., Qian, C., Lim, K.H., England, L.J., Yu, K.F. et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N.Engl.J.Med.* 2004; 350:672-83
- [23] Bogos, K., Renyi-Vamos, F., Dobos, J., Kenessey, I., Tovari, J., Timar, J. et al. High VEGFR-3-positive circulating lymphatic/vascular endothelial progenitor cell level is associated with poor prognosis in human small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.* 2009; 15:1741-6
- [24] Lindauer, A. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling and Simulation of Biomarker Response to Venlafaxine and Sunitinib Administration. Universität Bonn, 2011
- [25] George, M.L., Eccles, S.A., Tutton, M.G., Abulafi, A.M., and Swift, R.I. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging? *Clin.Cancer Res.* 2000; 6:3147-52
- [26] Pinedo, H.M., Verheul, H.M., D'Amato, R.J., and Folkman, J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet.* 1998; 352:1775-7
- [27] Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., and Williams, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J.Exp.Med.* 1971; 133:275-88
- [28] Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N.Engl.J.Med.* 1971; 285:1182-6
- [29] Rak, J., Mitsuhashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T. et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 1995; 55:4575-80
- [30] Ferrara, N. and vis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.Rev.* 1997; 18:4-25
- [31] Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N.Engl.J.Med.* 1986; 315:1650-1659
- [32] Jussila, L. and Alitalo, K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev.* 2002; 82:673-700

- [33] Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W., and Raymond, E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2007; 6:734-45
- [34] Jain, R.K., Tong, R.T., and Munn, L.L. Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and lymphatic metastasis: insights from a mathematical model. *Cancer Res.* 2007; 67:2729-35
- [35] Sun, L., Liang, C., Shirazian, S., Zhou, Y., Miller, T., Cui, J. et al. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J.Med.Chem.* 2003; 46:1116-9
- [36] Pfizer. SUTENT - Highlights of Prescribing Information. Stand: 2006. Verfügbar unter: <http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=607>, letzter Zugriff: 15. Okt. 2012
- [37] Di Gion, P., Kanefendt, F., Lindauer, A., Scheffler, M., Doroshenko, O., Fuhr, U. et al. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles. *Clin.Pharmacokinet.* 2011; 50:551-603
- [38] Mendel, D.B., Laird, A.D., Xin, X., Louie, S.G., Christensen, J.G., Li, G. et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:327-37
- [39] Britten, C.D., Kabbinavar, F., Hecht, J.R., Bello, C.L., Li, J., Baum, C. et al. A phase I and pharmacokinetic study of sunitinib administered daily for 2 weeks, followed by a 1-week off period. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2008; 61:515-24
- [40] Faivre, S., Delbaldo, C., Vera, K., Robert, C., Lozahic, S., Lassau, N. et al. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J.Clin.Oncol.* 2006; 24:25-35
- [41] Escudier, B., Roigas, J., Gillessen, S., Harmenberg, U., Srinivas, S., Mulder, S.F. et al. Phase II study of sunitinib administered in a continuous once-daily dosing regimen in patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2009; 27:4068-75
- [42] George, S., Blay, J.Y., Casali, P.G., Le, C.A., Stephenson, P., Deprimo, S.E. et al. Clinical evaluation of continuous daily dosing of sunitinib malate in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after imatinib failure. *Eur.J.Cancer.* 2009; 45:1959-68

- [43] Houk, B.E., Bello, C.L., Kang, D., and Amantea, M. A population pharmacokinetic meta-analysis of sunitinib malate (SU11248) and its primary metabolite (SU12662) in healthy volunteers and oncology patients. *Clin.Cancer Res.* 2009; 15:2497-506
- [44] Goodman, V.L., Rock, E.P., Dagher, R., Ramchandani, R.P., Abraham, S., Gobburu, J.V. et al. Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 2007; 13:1367-73
- [45] Motzer, R.J., Hutson, T.E., Olsen, M.R., Hudes, G.R., Burke, J.M., Edenfield, W.J. et al. Randomized phase II trial of sunitinib on an intermittent versus continuous dosing schedule as first-line therapy for advanced renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2012; 30:1371-7
- [46] Carmeliet, P. and Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011; 473:298-307
- [47] Schnoor, M., Waldmann, A., Eberle, A., Holleczeck, B., and Katalinic, A. Colorectal cancer incidence in Germany: Stage-shift 6 years after implementation of a colonoscopy screening program. *Cancer Epidemiol.* 2012; 36:417-20
- [48] Robert Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2007/2008. 2012
- [49] Thews, G., Mutschler, E., and Vaupel, P. Anatomie Physiology Pathophysiology des Menschen. 5. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1999
- [50] Mross, K. Study Protocol C-II-005/EUDRACT 2008-001515-37 Version 2.0. 2010
- [51] Guba, M., Seeliger, H., Kleespies, A., Jauch, K.W., and Bruns, C. Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *Int.J.Colorectal Dis.* 2004; 19:510-7
- [52] Laszlo, L. Predictive and prognostic factors in the complex treatment of patients with colorectal cancer. *Magy.Onkol.* 2010; 54:383-94
- [53] Preiß, J., Dornoff, W., Hagmann, F.G., and Schmieder, A. Onkologie 2012/2013 Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie. 16. Auflage. München: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH; 2012
- [54] Ruddon, R.W. Cancer Biology. 4. Auflage. New York: Oxford University Press, Inc.; 2007
- [55] Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C.D., Cleary, K.R., and Ellis, L.M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* 1995; 55:3964-8
- [56] Schmiegel, W., Pox, C., Reinacher-Schick, A., Adler, G., Fleig, W., Fölsch, U.R. et al. S3-Leitlinie "Kolorektales Karzinom". *Z.Gastroenterol.* 2008; 46:1-73

- 
- [57] Starling, N., Vazquez-Mazon, F., Cunningham, D., Chau, I., Tabernero, J., Ramos, F.J. et al. A phase I study of sunitinib in combination with FOLFIRI in patients with untreated metastatic colorectal cancer. *Ann.Oncol.* 2011;119-27
- [58] Biomarker Definition Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2001; 69:89-95
- [59] Findlay, J.W., Smith, W.C., Lee, J.W., Nordblom, G.D., Das, I., DeSilva, B.S. et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2000; 21:1249-73
- [60] Jubb, A.M., Oates, A.J., Holden, S., and Koeppen, H. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat.Rev.Cancer.* 2006; 6:626-35
- [61] Sessa, C., Guibal, A., Del, C.G., and Ruegg, C. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nat.Clin.Pract.Oncol.* 2008; 5:378-91
- [62] Chau, C.H., Rixe, O., McLeod, H., and Figg, W.D. Validation of analytic methods for biomarkers used in drug development. *Clin.Cancer Res.* 2008; 14:5967-5976
- [63] Park, J.W., Kerbel, R.S., Kelloff, G.J., Barrett, J.C., Chabner, B.A., Parkinson, D.R. et al. Rationale for biomarkers and surrogate end points in mechanism-driven oncology drug development. *Clin.Cancer Res.* 2004; 10:3885-96
- [64] Colburn, W.A. Optimizing the use of biomarkers, surrogate endpoints, and clinical endpoints for more efficient drug development. *J.Clin.Pharmacol.* 2000; 40:1419-27
- [65] Colburn, W.A. Biomarkers in drug discovery and development: from target identification through drug marketing. *J.Clin.Pharmacol.* 2003; 43:329-41
- [66] Colburn, W.A. and Lee, J.W. Biomarkers, validation and pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling. *Clin.Pharmacokinet.* 2003; 42:997-1022
- [67] Burstein, H.J., Elias, A.D., Rugo, H.S., Cobleigh, M.A., Wolff, A.C., Eisenberg, P.D. et al. Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J.Clin.Oncol.* 2008; 26:1810-6
- [68] Deprimo, S.E. and Bello, C. Surrogate biomarkers in evaluating response to anti-angiogenic agents: focus on sunitinib. *Ann.Oncol.* 2007; 18 Suppl 10:x11-9
- [69] Harmon, C.S., Deprimo, S.E., Raymond, E., Cheng, A.L., Boucher, E., Douillard, J.Y. et al. Mechanism-related circulating proteins as biomarkers for clinical outcome in patients with unresectable hepatocellular carcinoma receiving sunitinib. *J.Transl.Med.* 2011; 9:120-33
- [70] Kontovinis, L.F., Papazisis, K.T., Touplikioti, P., Andreadis, C., Mouratidou, D., and Kortsaris, A.H. Sunitinib treatment for patients with clear-cell metastatic renal cell carcinoma: clinical outcomes and plasma angiogenesis markers. *BMC Cancer.* 2009; 9:82-91

- 
- [71] Longo, R. and Gasparini, G. Anti-VEGF therapy: the search for clinical biomarkers. *Expert.Rev.Mol.Diagn.* 2008; 8:301-14
- [72] Motzer, R.J., Michaelson, M.D., Redman, B.G., Hudes, G.R., Wilding, G., Figlin, R.A. et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2006; 24:16-24
- [73] Norden-Zfoni, A., Desai, J., Manola, J., Beaudry, P., Force, J., Maki, R. et al. Blood-Based Biomarkers of SU11248 Activity and Clinical Outcome in Patients with Metastatic Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor. *Clin.Cancer Res.* 2007; 13:2643-50
- [74] Rini, B.I., Michaelson, M.D., Rosenberg, J.E., Bukowski, R.M., Sosman, J.A., Stadler, W.M. et al. Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2008; 26:3743-8
- [75] Saltz, L.B., Rosen, L.S., Marshall, J.L., Belt, R.J., Hurwitz, H.I., Eckhardt, S.G. et al. Phase II trial of sunitinib in patients with metastatic colorectal cancer after failure of standard therapy. *J.Clin.Oncol.* 2007; 25:4793-4799
- [76] Raem, A.M. and Rauch, P. Immunoassays. 1. Auflage. München: Spektrum Akademischer Verlag , Elsevier GmbH; 2007
- [77] European Medicines Agency Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. 2011
- [78] Findlay, J.W. Some important considerations for validation of ligand-binding assays. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 2008; 877:2192-7
- [79] FDA Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services FDA (CDER) and (CVM). 2001
- [80] Lee, J.W., Devanarayan, V., Barrett, Y.C., Weiner, R., Allinson, J., Fountain, S. et al. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm.Res.* 2006; 23:312-28
- [81] DeSilva, B., Smith, W., Weiner, R., Kelley, M., Smolec, J., Lee, B. et al. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm.Res.* 2003; 20:1885-900
- [82] Derendorf, H., Gramatte, T., Schäfer, H.G., and Staab, A. Pharmakokinetik kompakt Grundlagen und Praxisrelevanz. 3. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2011
- [83] Bonate, P.L. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation. 2. Auflage. New York (Dordrecht, Heidelberg, London): Springer Science + Business Media,Inc.; 2011
- [84] Bonate, P.L. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation. 1. Auflage. New York (Dordrecht, Heidelberg, London): Springer Science+Business Media,Inc.; 2006



- 
- [85] Beal, S.L., Sheiner, L.B., and Boeckmann, A.J. NONMEM Users Guide (1989-2006). Icon Development Solutions, Ellicott City,MD: 2006
- [86] Ette, E.I. and Williams, P.J. Pharmacometrics. 1. Auflage. New Jersey: John Wiley & Sons,Inc.; 2007
- [87] Derendorf, H., Lesko, L.J., Chaikin, P., Colburn, W.A., Lee, P., Miller, R. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug research and development. *J.Clin.Pharmacol.* 2000; 40:1399-418
- [88] FDA Guidance for Industry - Population Pharmacokinetics. US Department of Health and Human Services FDA (CDER) and (CVM); 1999
- [89] European Medicines Agency. Guidance on Reporting the Results of Populations Pharmacokinetic Analysis. CHMP/EWP/185990/06; 2007
- [90] Collett, D. Modelling Survival Data in Medicinal Research. 2. Auflage. London NewYork Washington D.C.: Chapman&Hall/CRC; 2003
- [91] Fleming, T.R. and Lin, D.Y. Survival analysis in clinical trials: past developments and future directions. *Biometrics.* 2000; 56:971-83
- [92] Kaplan, E.L. and Meier, P. Nonparametric-Estimation from Incomplete Observations. *JASA.* 1958; 53:457-81
- [93] Cox, D.R. Regression Models and Life-Tables. *J.Roy.Statist.Soc.Ser.B.* 1972; 34:187-220
- [94] Weiß, C. Basiswissen Medizinische Statistik. 3. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005
- [95] Spruance, S.L., Reid, J.E., Grace, M., and Samore, M. Hazard ratio in clinical trials. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2004; 48:2787-92
- [96] Holford, N. H and Lavielle, M. Time to Event Tutorial. Stand: 2011. Verfügbar unter: [www.page-meeting.org/pdf\\_assets/2573-time-to-event-tutorial.pdf](http://www.page-meeting.org/pdf_assets/2573-time-to-event-tutorial.pdf), letzter Zugriff: 6. Juli 2012
- [97] Lindauer, A., Di Gion P., Kanefendt, F., Tomalik-Scharte, D., Kinzig, M., Rodamer, M. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of biomarker response to sunitinib in healthy volunteers. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2010; 87:601-8
- [98] Lindbom, L., Pihlgren, P., and Jonsson, E.N. PsN-Toolkit--a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput.Methods Programs Biomed.* 2005; 79:241-57
- [99] Mouawad, R., Spano, J.P., Comperat, E., Capron, F., and Khayat, D. Tumoural expression and circulating level of VEGFR-3 (Flt-4) in metastatic melanoma patients: correlation with clinical parameters and outcome. *Eur.J.Cancer.* 2009; 45:1407-14
- [100] Miller, K.J., Bowsher, R.R., Celniker, A., Gibbons, J., Gupta, S., Lee, J.W. et al. Workshop on bioanalytical methods validation for macromolecules: summary report. *Pharm.Res.* 2001; 18:1373-83

- [101] Chan, P.L. and Holford, N.H. Drug treatment effects on disease progression. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2001; 41:625-59
- [102] Cummings, J., Ward, T.H., Greystoke, A., Ranson, M., and Dive, C. Biomarker method validation in anticancer drug development. *Br.J.Pharmacol.* 2008; 153:646-56
- [103] Smolec, J., DeSilva, B., Smith, W., Weiner, R., Kelly, M., Lee, B. et al. Bioanalytical method validation for macromolecules in support of pharmacokinetic studies. *Pharm.Res.* 2005; 22:1425-1431
- [104] Valentin, M.A., Ma, S., Zhao, A., Legay, F., and Avrameas, A. Validation of immunoassay for protein biomarkers: bioanalytical study plan implementation to support pre-clinical and clinical studies. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2011; 55:869-77
- [105] R&D Systems. DuoSet ELISA human VEGF R3 (Flt-4) (DY349). Stand: 2008. Verfügbar unter: [www.rndsystems.com/pdf/dy349.pdf](http://www.rndsystems.com/pdf/dy349.pdf), letzter Zugriff: 15. April 2008
- [106] Findlay, J.W. and Dillard, R.F. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS.J.* 2007; 9:E260-7
- [107] Therasse, P., Arbuck, S.G., Eisenhauer, E.A., Wanders, J., Kaplan, R.S., Rubinstein, L. et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J.Natl.Cancer Inst.* 2000; 92:205-16
- [108] Rodamer, M., Elsinghorst, P.W., Kinzig, M., Gutschow, M., and Sorgel, F. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry procedure for the quantification of sunitinib (SU11248) and its active metabolite, N-desethyl sunitinib (SU12662), in human plasma: application to an explorative study. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 2011; 879:695-706
- [109] Elsinghorst, P.W. and Gutschow, M. Synthesis of (2)H- and (13)C-labelled sunitinib and its primary metabolite. *J.Label Compd.Radiopharm.* 2009; 52:360-5
- [110] Applichem GmbH, Darmstadt. Product Information CrossDown Buffer. Stand: 24-4-2012. Verfügbar unter: <http://www.applichem.com/de/shop/produktdetail/as/crossdown-buffer/>, letzter Zugriff: 7. Juli 2011
- [111] Hormbrey, E., Gillespie, P., Turner, K., Han, C., Roberts, A., McGrouther, D. et al. A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful? *Clin.Exp.Metastasis.* 2002; 19:651-63

- [112] Port, R.E. Kapitel: IV-8.1 Populations-Pharmakokinetik und individuelle Dosisanpassung. In: Zeller, W.J. and zur Hausen, H. Onkologie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklung. 16. Ergänzungslieferung. ecomed MEDIZIN Hamburg, 2003:1-14.
- [113] Boeckmann, A. J., Sheiner, L. B., and Beal, S. L. NONMEM Users Guide - Part V Introductory Guide. Stand: 2011. Verfügbar unter: <ftp://nonmem.iconplc.com/Public/nonmem720/guides/v.pdf>, letzter Zugriff: 7.Juni 2012
- [114] Sheiner, L.B. and Beal, S.L. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. J Pharmacokinet.Biopharm. 1980; 8:553-71
- [115] Beal, S. L. and Sheiner, L. B. NONMEM Users Guide - Part VII Conditional Estimation Methods. Stand: 1998. Verfügbar unter: <ftp://nonmem.iconplc.com/Public/nonmem720/guides/vii.pdf>, letzter Zugriff: 6.Juli 2012
- [116] Ribbing, J. and Jonsson, E.N. Power, selection bias and predictive performance of the Population Pharmacokinetic Covariate Model. J Pharmacokinet.Pharmacodyn. 2004; 31:109-34
- [117] Karlsson, M.O. and Sheiner, L.B. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. J.Pharmacokinet.Biopharm. 1993; 21:735-50
- [118] Karlsson, M.O. and Savic, R.M. Diagnosing model diagnostics. Clin.Pharmacol.Ther. 2007; 82:17-20
- [119] Beal, S. L. and Sheiner, L. B. NONMEM Users Guide - Part I Users Basic Guide. Stand: 1989. Verfügbar unter: <ftp://nonmem.iconplc.com/Public/nonmem720/guides/i.pdf>, letzter Zugriff: 6.Juli 2012
- [120] Savic, R.M. and Karlsson, M.O. Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. AAPS.J. 2009; 11:558-69
- [121] Hooker, A.C., Staats, C.E., and Karlsson, M.O. Conditional weighted residuals (CWRES): a model diagnostic for the FOCE method. Pharm.Res. 2007; 24:2187-97
- [122] Jonsson, E.N. and Karlsson, M.O. Xpose--an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. Comput.Methods Programs Biomed. 1999; 58:51-64
- [123] Karlsson M.O. and Holford, N. H. Model Evaluation Visual Predictive Check. Stand: 2008. Verfügbar unter: [www.page-meeting.org/pdf\\_assets/8694-Karlsson\\_Holford\\_VPC\\_Tutorial\\_hires.pdf](http://www.page-meeting.org/pdf_assets/8694-Karlsson_Holford_VPC_Tutorial_hires.pdf), letzter Zugriff: 6.Juli 2012
- [124] Wade, J.R., Kelman, A.W., Howie, C.A., and Whiting, B. Effect of misspecification of the absorption process on subsequent parameter estimation in population analysis. J.Pharmacokinet.Biopharm. 1993; 21:209-22

- [125] Karlsson, M.O., Jonsson, E.N., Wiltse, C.G., and Wade, J.R. Assumption testing in population pharmacokinetic models: illustrated with an analysis of moxonidine data from congestive heart failure patients. *J Pharmacokinet.Biopharm.* 1998; 26:207-246
- [126] Sheiner, L.B. and Beal, S.L. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet.Biopharm.* 1981; 9:503-12
- [127] Zandvliet, A.S. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling and simulation of the investigational anticancer agent indisulam. University Utrecht, 2007
- [128] Houk, B.E., Bello, C.L., Poland, B., Rosen, L.S., Demetri, G.D., and Motzer, R.J. Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2009;357-71
- [129] Heagerty, P.J. and Zheng, Y. Survival model predictive accuracy and ROC curves. *Biometrics.* 2005; 61:92-105
- [130] Xu, R.H. and O'Quigley, J. Proportional hazards estimate of the conditional survival function. *J.Roy.Statist.Soc.Ser.B.* 2000; 62:667-80
- [131] Beaumont, R. An Introduction to statistics - Survival Analysis 1. Stand: 15-10-2010. Verfügbar unter: [www.floppybunny.org/robin/web/virtualclassroom/stats/statistics2/part14\\_survival\\_analysis.pdf](http://www.floppybunny.org/robin/web/virtualclassroom/stats/statistics2/part14_survival_analysis.pdf), letzter Zugriff: 6. Juni 2012
- [132] Therneau, T. Package 'survival'. Stand: 15-2-2012. Verfügbar unter: <http://cran.r-project.org/web/packages/survival/survival.pdf>, letzter Zugriff: 6.Juli 2012
- [133] Wang, Y., Sung, C., Dartois, C., Ramchandani, R., Booth, B.P., Rock, E. et al. Elucidation of relationship between tumor size and survival in non-small-cell lung cancer patients can aid early decision making in clinical drug development. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2009; 86:167-74
- [134] Breslow, N. Covariance Analysis of Censored Survival Data. *Biometrics.* 1974; 30:89-99
- [135] Efron, B. Efficiency of Coxs Likelihood Function for Censored Data. *J.Am.Stat.Assoc.* 1977; 72:557-65
- [136] Nathanson, B.H. and Higgins, T.L. An introduction to statistical methods used in binary outcome modeling. *Semin.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* 2008; 12:153-66
- [137] Wang, J., Lee, J., Burns, D., Doherty, D., Brunner, L., Peterson, M. et al. "Fit-for-purpose" method validation and application of a biomarker (C-terminal telopeptides of type 1 collagen) in denosumab clinical studies. *AAPS.J.* 2009; 11:385-94

- [138] Fruehauf, J.P., Lutzky, J., McDermott, D.F., Brown, C.K., Meric, J.B., Rosbrook, B. et al. Multicenter, Phase II Study of Axitinib, a Selective Second-Generation Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1, 2, 3, in Patients with Metastatic Melanoma. *Clin.Cancer Res.* 2011;7462-9
- [139] Lee, J.W. and Hall, M. Method validation of protein biomarkers in support of drug development or clinical diagnosis/prognosis. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 2008:1259-71
- [140] Kelley, M. and DeSilva, B. Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules. *AAPS.J.* 2007; 9:E156-63
- [141] Viswanathan, C.T., Bansal, S., Booth, B., DeStefano, A.J., Rose, M.J., Sailstad, J. et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm.Res.* 2007; 24:1962-73
- [142] Hughes, D.C. Alternative splicing of the human VEGFR-3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus. *J.Mol.Evol.* 2001; 53:77-9
- [143] R&D Systems. Quantikine Human Soluble VEGFR R2 Immunoassay (DVR200). Stand: 2009. Verfügbar unter: [www.rndsystems.com/pdf/dvr200.pdf](http://www.rndsystems.com/pdf/dvr200.pdf), letzter Zugriff: 27. Aug. 2012
- [144] R&D Systems. QuantiGlo ELISA Human VEGF Immunoassay (QVE00B). Stand: 2012. Verfügbar unter: [www.rndsystems.com/pdf/qve00b.pdf](http://www.rndsystems.com/pdf/qve00b.pdf), letzter Zugriff: 27. Aug. 2012
- [145] Wartiovaara, U., Salven, P., Mikkola, H., Lassila, R., Kaukonen, J., Joukov, V. et al. Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb.Haemost.* 1998; 80:171-5
- [146] Niers, T.M., Richel, D.J., Meijers, J.C., and Schlingemann, R.O. Vascular endothelial growth factor in the circulation in cancer patients may not be a relevant biomarker. *PLoS.One.* 2011; 6:e19873
- [147] Jelkmann, W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin.Chem.* 2001; 47:617-23
- [148] Gunsilius, E., Petzer, A., Stockhammer, G., Nussbaumer, W., Schumacher, P., Clausen, J. et al. Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood. *Oncology.* 2000; 58:169-74
- [149] Verheul, H.M., Hoekman, K., Luykx-de, B.S., Eekman, C.A., Folman, C.C., Broxterman, H.J. et al. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin.Cancer Res.* 1997; 3:2187-90
- [150] Werther, K., Christensen, I.J., and Nielsen, H.J. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand.J.Clin.Lab Invest.* 2002; 62:343-50

- [151] Wynendaele, W., Derua, R., Hoylaerts, M.F., Pawinski, A., Waelkens, E., de Bruijn, E.A. et al. Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: a key to study an angiogenic marker in vivo? *Ann.Oncol.* 1999; 10:965-71
- [152] Ebos, J.M., Bocci, G., Man, S., Thorpe, P.E., Hicklin, D.J., Zhou, D. et al. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol.Cancer Res.* 2004; 2:315-26
- [153] Gisleskog, P.O., Karlsson, M.O., and Beal, S.L. Use of prior information to stabilize a population data analysis. *J.Pharmacokinet.Pharmacodyn.* 2002; 29:473-505
- [154] Savic, R. M. Population Pharmacokinetics of Atazanavir in Naive HIV-Infected Patients using Medication Events Monitoring System (MEMS) for drug intake timing. Stand: 2010. Verfügbar unter: [www.page-meeting.eu/pdf\\_assets/6044-Atazanavir\\_PAGE\\_v20100607e%20%5BCompatibility%20Mode%5D.pdf](http://www.page-meeting.eu/pdf_assets/6044-Atazanavir_PAGE_v20100607e%20%5BCompatibility%20Mode%5D.pdf), letzter Zugriff: 6. Juli 2012
- [155] Weidner, K.R. Einfluss von Probeentnahmeschema und Compliance auf die Abschätzung individueller PK/PD-Parameter von Sunitinib. Universität Bonn, 2012
- [156] Fiedler, W., Mesters, R., Heuser, M., Ehninger, G., Berdel, W.E., Zirrgiebel, U. et al. An open-label, Phase I study of cediranib (RECENTIN) in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk.Res.* 2010; 34:196-202
- [157] Hanrahan, E.O., Lin, H.Y., Kim, E.S., Yan, S., Du, D.Z., McKee, K.S. et al. Distinct patterns of cytokine and angiogenic factor modulation and markers of benefit for vandetanib and/or chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 2010; 28:193-201
- [158] Llovet, J.M., Pena, C.E., Lathia, C.D., Shan, M., Meinhardt, G., and Bruix, J. Plasma Biomarkers as Predictors of Outcome in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 2012; 18:2290-300
- [159] Nikolinakos, P.G., Altorki, N., Yankelevitz, D., Tran, H.T., Yan, S., Rajagopalan, D. et al. Plasma cytokine and angiogenic factor profiling identifies markers associated with tumor shrinkage in early-stage non-small cell lung cancer patients treated with pazopanib. *Cancer Res.* 2010; 70:2171-9
- [160] Pena, C., Lathia, C., Shan, M., Escudier, B., and Bukowski, R.M. Biomarkers predicting outcome in patients with advanced renal cell carcinoma: Results from sorafenib phase III Treatment Approaches in Renal Cancer Global Evaluation Trial. *Clin.Cancer Res.* 2010; 16:4853-63
- [161] Eskens, F.A., Steeghs, N., Verweij, J., Bloem, J.L., Christensen, O., van, D.L. et al. Phase I dose escalation study of telatinib, a tyrosine kinase inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor 2 and 3, platelet-derived growth factor receptor beta, and c-Kit, in patients with advanced or metastatic solid tumors. *J.Clin.Oncol.* 2009; 27:4169-76

- [162] Ebos, J.M., Lee, C.R., Christensen, J.G., Mutsaers, A.J., and Kerbel, R.S. Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2007; 104:17069-74
- [163] Ebos, J.M., Lee, C.R., Bogdanovic, E., Alami, J., Van, S.P., Francia, G. et al. Vascular endothelial growth factor-mediated decrease in plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 levels as a surrogate biomarker for tumor growth. *Cancer Res.* 2008; 68:521-9
- [164] Loupakis, F., Falcone, A., Masi, G., Fioravanti, A., Kerbel, R.S., Del, T.M. et al. Vascular endothelial growth factor levels in immunodepleted plasma of cancer patients as a possible pharmacodynamic marker for bevacizumab activity. *J.Clin.Oncol.* 2007; 25:1816-8
- [165] Otrrock, Z.K., Hatoum, H.A., Musallam, K.M., Awada, A.H., and Shamseddine, A.I. Is VEGF a predictive biomarker to anti-angiogenic therapy? *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2010:103-11
- [166] Pircher, A., Hilbe, W., Heidegger, I., Drevs, J., Tichelli, A., and Medinger, M. Biomarkers in tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Int.J.Mol.Sci.* 2011; 12:7077-99
- [167] Horowitz, N.S., Penson, R.T., Duda, D.G., di, T.E., Boucher, Y., Ancukiewicz, M. et al. Safety, Efficacy, and Biomarker Exploration in a Phase II Study of Bevacizumab, Oxaliplatin, and Gemcitabine in Recurrent Mullerian Carcinoma. *Clin.Ovarian.Cancer Other Gynecol.Malign.* 2011; 4:26-33
- [168] Kopetz, S., Hoff, P.M., Morris, J.S., Wolff, R.A., Eng, C., Glover, K.Y. et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J.Clin.Oncol.* 2010; 28:453-9
- [169] Willett, C.G., Duda, D.G., di, T.E., Boucher, Y., Ancukiewicz, M., Sahani, D.V. et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. *J.Clin.Oncol.* 2009; 27:3020-6
- [170] Jantus-Lewintre, E., Sanmartin, E., Sirera, R., Blasco, A., Sanchez, J.J., Taron, M. et al. Combined VEGF-A and VEGFR-2 concentrations in plasma: diagnostic and prognostic implications in patients with advanced NSCLC. *Lung Cancer.* 2011; 74:326-31
- [171] Clarijs, R., Schalkwijk, L., Hofmann, U.B., Ruiters, D.J., and de Waal, R.M. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression on tumor microvasculature as a new progression marker in human cutaneous melanoma. *Cancer Res.* 2002; 62:7059-65
- [172] Grau, S.J., Trillsch, F., Herms, J., Thon, N., Nelson, P.J., Tonn, J.C. et al. Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade. *J.Neurooncol.* 2007; 82:141-50

- [173] Valtola, R., Salven, P., Heikkila, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M. et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am.J.Pathol.* 1999; 154:1381-90
- [174] Achen, M.G. and Stacker, S.A. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2008; 1131:225-34
- [175] Bello, C.L. et al. Analysis of circulating biomarkers of sunitinib malate in patients with unresectable neuroendocrine tumors (NET): VEGF, IL-8, and soluble VEGF receptors 2 and 3. ASCO Meeting, Abstract No: 4045. 2006
- [176] Isambert, N., Freyer, G., Zanetta, S., You, B., Fumoleau, P., Falandry, C. et al. Phase I dose-escalation study of intravenous aflibercept in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Clin.Cancer Res.* 2012; 18:1743-50
- [177] Lockhart, A.C., Rothenberg, M.L., Dupont, J., Cooper, W., Chevalier, P., Sternas, L. et al. Phase I study of intravenous vascular endothelial growth factor trap, aflibercept, in patients with advanced solid tumors. *J.Clin.Oncol.* 2010; 28:207-14
- [178] Lin, J., Lalani, A.S., Harding, T.C., Gonzalez, M., Wu, W.W., Luan, B. et al. Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res.* 2005; 65:6901-6909
- [179] Chirila, C., Odom, D., Devercelli, G., Khan, S., Sherif, B.N., Kaye, J.A. et al. Meta-analysis of the association between progression-free survival and overall survival in metastatic colorectal cancer. *Int.J.Colorectal Dis.* 2012; 27:623-34
- [180] Johnson, K.R., Ringland, C., Stokes, B.J., Anthony, D.M., Freemantle, N., Irs, A. et al. Response rate or time to progression as predictors of survival in trials of metastatic colorectal cancer or non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2006; 7:741-6
- [181] Tang, P.A., Bentzen, S.M., Chen, E.X., and Siu, L.L. Surrogate end points for median overall survival in metastatic colorectal cancer: literature-based analysis from 39 randomized controlled trials of first-line chemotherapy. *J.Clin.Oncol.* 2007; 25:4562-8
- [182] Blanke, C.D., Bot, B.M., Thomas, D.M., Bleyer, A., Kohne, C.H., Seymour, M.T. et al. Impact of young age on treatment efficacy and safety in advanced colorectal cancer: a pooled analysis of patients from nine first-line phase III chemotherapy trials. *J.Clin.Oncol.* 2011; 29:2781-6
- [183] Edwards, B.K., Ward, E., Kohler, B.A., Ehemann, C., Zaubler, A.G., Anderson, R.N. et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer.* 2010; 116:544-73



- [184] Fietkau, R., Zettl, H., Klocking, S., and Kundt, G. Incidence, therapy and prognosis of colorectal cancer in different age groups - A population-based cohort study of the rostock cancer registry. *Strahlenther Onkol.* 2004; 180:478-87
- [185] Gatta, G., Faivre, J., Capocaccia, R., and Ponz de, L.M. Survival of colorectal cancer patients in Europe during the period 1978-1989. EURO CARE Working Group. *Eur.J.Cancer.* 1998; 34:2176-83
- [186] O'Connell, J.B., Maggard, M.A., Liu, J.H., Etzioni, D.A., Livingston, E.H., and Ko, C.Y. Do young colon cancer patients have worse outcomes? *World J.Surg.* 2004; 28:558-62
- [187] O'Connell, J.B., Maggard, M.A., Liu, J.H., Etzioni, D.A., and Ko, C.Y. Are survival rates different for young and older patients with rectal cancer? *Dis.Colon Rectum.* 2004; 47:2064-9
- [188] Irvin, T.T. Prognosis of colorectal cancer in the elderly. *Br.J Surg.* 1988; 75:419-21
- [189] Mulcahy, H.E., Patchett, S.E., Daly, L., and O'Donoghue, D.P. Prognosis of elderly patients with large bowel cancer. *Br.J Surg.* 1994; 81:736-8
- [190] Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(GEKID). Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen in den Bundesländern. Stand: 14-5-2012. Verfügbar unter: [www.gekid.de](http://www.gekid.de), letzter Zugriff: 6. Juli 2012
- [191] Concato, J., Peduzzi, P., Holford, T.R., and Feinstein, A.R. Importance of events per independent variable in proportional hazards analysis. I. Background, goals, and general strategy. *J.Clin.Epidemiol.* 1995; 48:1495-1501
- [192] Peduzzi, P., Concato, J., Feinstein, A.R., and Holford, T.R. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates. *J.Clin.Epidemiol.* 1995; 48:1503-10
- [193] Hansson, E. PK/PD Modelling of VEGF, sVEGFR-2, sVEGFR-3 and sKIT as Biomarkers of Tumor Response and Overall Survival Following Sunitinib Treatment in GIST. Stand: 9-6-2011. Verfügbar unter: [www.page-meeting.org/pdf\\_assets/2402-PAGE%20presentation\\_2011\\_Emma\\_Hansson.pdf](http://www.page-meeting.org/pdf_assets/2402-PAGE%20presentation_2011_Emma_Hansson.pdf), letzter Zugriff: 12. Dez. 2011
- [194] Ebos, J.M., Lee, C.R., and Kerbel, R.S. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. *Clin.Cancer Res.* 2009; 15:5020-5
- [195] Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P. et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000; 355:1041-7

- [196] Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J. et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N.Engl.J.Med.* 2000; 343:905-14
- [197] Sacks, H., Chalmers, T.C., and Smith, H., Jr. Randomized versus historical controls for clinical trials. *Am.J.Med.* 1982; 72:233-40
- [198] Tsuji, Y., Satoh, T., Tsuji, A., Muro, K., Yoshida, M., Nishina, T. et al. First-line Sunitinib plus FOLFIRI in Japanese Patients with Unresectable/Metastatic Colorectal Cancer: a Phase II Study. *Cancer Sci.* 2012:1502-7
- [199] US National Institute of Health. Study of FOLFIRI Chemotherapy with or without Sunitinib in Patients with metastatic colorectal cancer. Stand: 10-5-2012. Verfügbar unter: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), letzter Zugriff: 6. Juli 2012
- [200] Van Cutsem, E., Kohne, C.H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.R., Makhson, A. et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 2009; 360:1408-17
- [201] Feifel, G. Kontroverse Standpunkte bei der Anwendung historischer Kontrollen. Gibt es ein Alles- oder Nichts-Gesetz? *Langenbecks Arch.Chir.* 1981; 355:399-409
- [202] Carrato, A. et al. Final results from a randomized, double-blind, phase III study of sunitinib plus FOLFIRI vs. placebo plus FOLFIRI in first-line treatment of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). 12th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona. 2010
- [203] Blesa, J.M. and Pulido, E.G. Colorectal cancer: response to sunitinib in a heavily pretreated colorectal cancer patient. *Anticancer Drugs.* 2010; 21 Suppl 1:S23-6
- [204] Haouala, A., Zanolari, B., Rochat, B., Montemurro, M., Zaman, K., Duchosal, M.A. et al. Therapeutic Drug Monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 2009; 877:1982-96
- [205] Demetri, G.D. Therapeutic monitoring of drug plasma concentrations and improved clinical outcomes in GIST. *Clin.Adv.Hematol.Oncol.* 2009; 7:S6-7
- [206] Gotta, V., Widmer, N., Montemurro, M., Leyvraz, S., Haouala, A., Decosterd, L.A. et al. Therapeutic drug monitoring of imatinib: bayesian and alternative methods to predict trough levels. *Clin.Pharmacokinet.* 2012; 51:187-201
- [207] Picard, S., Titier, K., Etienne, G., Teilhet, E., Ducint, D., Bernard, M.A. et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2007; 109:3496-9
- [208] Mena, A.C., Pulido, E.G., and Guillen-Ponce, C. Understanding the molecular-based mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitor: sunitinib. *Anticancer Drugs.* 2010; 21 Suppl 1:S3-11

- 
- [209] Kim, D.W., Jo, Y.S., Jung, H.S., Chung, H.K., Song, J.H., Park, K.C. et al. An orally administered multitarget tyrosine kinase inhibitor, SU11248, is a novel potent inhibitor of thyroid oncogenic RET/papillary thyroid cancer kinases. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2006; 91:4070-6
- [210] Bono, P., Rautiola, J., Utriainen, T., and Joensuu, H. Hypertension as predictor of sunitinib treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma. *Acta Oncol.* 2011; 50:569-73
- [211] Rini, B.I., Cohen, D.P., Lu, D.R., Chen, I., Hariharan, S., Gore, M.E. et al. Hypertension as a biomarker of efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *J.Natl.Cancer Inst.* 2011; 103:763-73
- [212] Rixe, O., Billefont, B., and Izzedine, H. Hypertension as a predictive factor of Sunitinib activity. *Ann.Oncol.* 2007; 18:1117
- [213] Rini, B.I., Schiller, J.H., Fruehauf, J.P., Cohen, E.E., Tarazi, J.C., Rosbrook, B. et al. Diastolic blood pressure as a biomarker of axitinib efficacy in solid tumors. *Clin.Cancer Res.* 2011; 17:3841-9



---

## Appendix

### Appendix 1

#### Interne Standardarbeitsanweisung zur Proteinbestimmung mittels ELISA

#### **Titel: Proteinbestimmung mittels ELISA**

Gültigkeitsbereich: Klinische Pharmazie

---

Autor(en): Friederike Kanefendt

Datum/Unterschrift:

\_\_\_\_\_

Datum/Prof. Dr. Ulrich Jaehde

\_\_\_\_\_

Datum/Friederike Kanefendt

#### Überprüfungsvermerk/Qualitätssicherung

\_\_\_\_\_

Name/Datum/Unterschrift

---

Verteiler:

- Laborleiter
- Mitarbeiter Labor 3.110
- Mitarbeiter Labor 3.116
- Mitarbeiter Labor 3.117
- weitere Mitarbeiter: \_\_\_\_\_

---

Inhalt

1. Zweck / Prinzip
2. Einsatzbereich
3. Messprinzip / Grundlagen
4. Verfahrenskenndaten / Validierung
5. Geräte / Geräteeinstellungen und Material
6. Chemikalien und herzustellende Lösungen
7. Durchführung der Analyse
8. Mitgeltende Unterlagen

---

## **1. Zweck / Prinzip**

Diese SOP regelt die Bestimmung von proteinogenen Analyten in humanem Kalium-EDTA-Plasma mit Hilfe von Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Sie sichert ein einheitliches Vorgehen bei der Vorbereitung der Proben, der Durchführung der Assays, die Qualität der Messungen und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

## **2. Einsatzbereich**

Die hier beschriebenen Methoden werden angewendet für die Bestimmung der proteinogenen Wachstumsfaktoren VEGF-A und VEGF-C und deren löslichen Rezeptoren sVEGFR-2 und sVEGFR-3 in humanem Kalium-EDTA-Plasma.

## **3. Messprinzip / Grundlagen**

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht. Generell unterscheidet man direkte und indirekte ELISA sowie Sandwich- und kompetitive ELISA. Das Messprinzip beruht auf der Bindung eines Analyten (Antigen) an freie (kompetitiv) oder immobilisierte für diesen Analyten spezifische Antikörper. Anschließend zugegebene Substrate werden von Enzymen zu farbigen Produkten umgesetzt oder führen durch die katalysierte chemische Umsetzung zu Lumineszenz, deren Intensität entsprechend mit einem UV-Spektrometer oder einem Luminometer gemessen werden kann. Diese Enzyme befinden sich entweder auf Zweitantikörpern (Sandwich-ELISA), die in einem weiteren Schritt den auf der Platte gebundenen Analyten binden, oder sind an das kompetitive Antigen (kompetitiver ELISA), das in definierter Menge hinzugefügt wird, gebunden. Anhand parallel vermessener Standards und einer entsprechenden Kalibrierkurve kann der Analyt quantifiziert werden.

## **4. Verfahrenskenndaten / Validierung**

Die zurzeit verwendeten Testkits für VEGF-A, VEGF-C und sVEGFR-2 wurden von der Firma R&D Systems validiert; die Validierungsparameter befinden sich im Herstellerprotokoll zum entsprechenden Test. Die Handhabung der Tests verläuft nach Protokoll (mitgeltende Unterlagen). Dieses entstammt den Anweisungen für die Verwendung der Testkits. Zur Bestimmung von sVEGFR-3 wird ein vom humanen VEGFR-3 DuoSet ELISA ausgehender, für humanes Plasma validierter, ELISA verwendet [Kanefendt et al. 2012]. Für die Validierungskriterien, wie Präzision und

Richtigkeit werden nach geltenden Vorschriften für Immunoassays Akzeptanzkriterien von  $\leq 20\%$  angenommen [DeSilva et al. 2003].

## 5. Geräte / Geräteeinstellungen und Material

### 5.1 Geräte

- Pipetten/ Mehrkanalpipetten
- UV-Spektrometer (*Thermo Electron Corporation Multiscan™ EX*)
- Luminometer (*FLUOstar® Optima*)
- Schüttler (*Heidolph Instruments Unimax™ 1010 (d=10mm)*)

### 5.2 Chemikalien und Reagenzien

- Human VEGF-A QuantiGlo™ VEGF-A ELISA Kit (#QVE00B)
- Human sVEGFR-2 Quantikine™ ELISA Kit (#DVR200)
- Human VEGF-C Quantikine™ ELISA Kit (#DVEC00)

Materialien zur Bestimmung von VEGF-A, VEGF-C und sVEGFR-2 sind im entsprechenden Testkit enthalten

sVEGFR-3 (R&D Systems, Abingdon, UK)

- Human sVEGFR-3 (Fit-4) DuoSet™ ELISA (#DY349)
- PURELAB® Plus Wasser
- Wash Buffer 0,05 % Tween® 20 in PBS, pH 7,2 – 7,4 (#WA126)
- Reagent Diluent Concentrate 2 – 1 % (#DY995)
- Substrate Solution (#DY999)
- Stop Solution – 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (#DY994)
- CrossDown™ Buffer (AppliChem, A6485)
- Fetales Kälberserum (FKS) (Sigma, F7524)

### 5.3 Verbrauchsmaterialien

- Clear Polystyrol MicroPlates™ (#DY990)
- Parafilm®
- Eppendorf Caps (0,5; 1,5; 2,0 mL)
- Polypropylen (PP)-Röhrchen (15, 50 mL)
- Pipettenspitzen

### 5.4 Geräteeinstellungen

- Die Geräte sind nach Angaben des Herstellers (Herstellerprotokoll) einzustellen.

- Zu beachten ist bei Verwendung des Schüttlers, dass die Angaben in rpm entsprechend auf den verwendeten Schüttler umgerechnet werden müssen.  
 $\rightarrow rcf = 1,118 \cdot 10^{-5} r \cdot rpm^2$   
 rcf: relative centrifugal force [x g]; r: Radius [cm]; rpm: rotations per minute [1/min]  $\rightarrow 1 \text{ inch} = 2,54 \text{ cm}$

## 6. Chemikalien und herzustellende Lösungen

VEGF-A, VEGF-C und sVEGFR-2:

Sämtliche Chemikalien, die verwendet werden, werden vom Hersteller mit jedem Testkit mitgeliefert. Hergestellt werden müssen Waschpuffer und Substratmischungen jeweils nach Anweisung des Herstellerprotokolls.

### sVEGFR-3

- PBS-Puffer
 

137 mM NaCl	8,0 g
2,7 mM KCl	0,2 g
8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,204 g
PURELAB® Plus Wasser	ad 1000,0 mL
pH 7,2 – 7,4; 0,2 µm filtriert	
- Reagent Diluent (1:10)
 

Reagent Diluent Concentrate 2	1 T
PURELAB® Plus Wasser	9 T
- Capture-Antikörper-Verdünnung (1:180)
 

Capture Antikörper-Konzentrat	1 T
PBS	179 T
- Detection-Antikörper-Verdünnung (1:225)
 

Detection Antikörper-Konzentrat	1 T
Reagent Diluent	224 T
- Streptavidin-HRP (1:200)
 

Streptavidin-HRP Konzentrat	1 T
Reagent Diluent	199 T
- Substrat-Mischung (1:1)
 

Reagent A	1 T
Reagent B	1 T
- FCS: 30 min bei 50 °C inaktivieren



## 7. Chemikalien und herzustellende Lösungen

### 7.1 Probenentnahme

Vollblut wird durch entsprechend qualifizierte Personen in Kalium-EDTA enthaltende Monovetten entnommen und innerhalb von 30 Minuten bei 4 °C, 1029 x g für 15 min zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wird aliquotiert und bei –80 °C eingefroren und gelagert.

### 7.2 Probenvorbereitung

Die Proben und alle weiteren Reagenzien, die für einen Test benötigt werden, werden auf Raumtemperatur gebracht. Das Plasma wird gegebenenfalls verdünnt (Angaben in den entsprechenden Versuchsprotokollen oder wenn Plasmakonzentrationen oberhalb des oberen Kalibrierbereiches zu erwarten sind).

Während der Inkubation kann es erforderlich sein, die Platten zu schütteln. Um Temperaturschwankungen während der Inkubationszeit durch die Erwärmung des Schüttlers zu vermeiden, wird eine Styroporplatte in entsprechender Größe zur Isolation zwischen Schütteloberfläche und Versuchsplatte gelegt.

### 7.3 Kalibrierung

Die Kalibrierung verläuft ebenfalls nach Herstellerprotokoll. Sie basiert auf einer Surrogatmatrix auf Basis von FCS. Humanes Plasma kann nicht als Kalibriermatrix verwendet werden, da die Analyten endogen in humanem Plasma vorkommen und keine humane Leermatrix existiert. Als Kalibriermodell dient in der Regel die 4-Parameter logistische Funktion (1) für Messungen, bei denen die UV-Absorption gemessen wird, und ein Cubic Spline bei der Messung der Lumineszenz.

$$(1) \quad Y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^p} \quad \text{4-Parameter logistische Funktion}$$

X: Konzentration

Y: Absorption

A<sub>1</sub>: untere Asymptote

A<sub>2</sub>: obere Asymptote

X<sub>0</sub>: Konzentration bei der halber Absorption

p: Steigungsparameter

Entsprechende Angaben werden ebenfalls in den entsprechenden Versuchsprotokollen gemacht. Zur Verifizierung der Kalibrierung werden Qualitätskontrollproben (QC) auf jeder Platte mit vermessen, die vom Hersteller geliefert werden. Diese müssen den

Herstellerspezifikationen entsprechen. Im Falle der Messung von sVEGFR-3 werden die QC-Proben selbst hergestellt und müssen eine Präzision (CV, %) und Richtigkeit (RE, %) von  $\leq \pm 20\%$  aufweisen.

Der Cubic Spline interpoliert Messsignale innerhalb der Kalibrierkurve und schätzt somit die Analytkonzentrationen entsprechend der Lumineszenz ab.

## 7.4 Messung

Die Proben werden auf der 96-Well-Platte entweder im UV-Spektrometer oder im Luminometer vermessen. Gemessen wird nach entsprechend vorgegebener Inkubationszeit nach Zugabe des Stopp-Reagenzes oder des zur Lumineszenz befähigten Substratgemisches. Erhalten werden die entsprechenden Rohdaten für Absorption oder Lumineszenz für jedes Well im Excel-Format.

## 7.5 Auswertung

Ausgewertet wird durch entsprechende Berechnung der Konzentrationen des Analyten mit Hilfe der abgeschätzten Parameter der Kalibrierkurve. Durch die parallel vermessenen QC-Proben, die innerhalb der Akzeptanzkriterien liegen müssen, kann überprüft werden, ob die Messungen akzeptiert werden können.

## 8. Chemikalien und herzustellende Lösungen

- Herstellerprotokoll QuantiGlo VEGF-A ELISA (#QVE00B)
- Herstellerprotokoll Quantikine VEGF-C ELISA (#DVEC00)
- Herstellerprotokoll Quantikine sVEGFR-2 ELISA (#DVR200)
- Herstellerprotokoll VEGFR-3 DuoSet (#DV349)
- Versuchsprotokoll zur VEGF-A-Bestimmung
- Versuchsprotokoll zur VEGF-C-Bestimmung
- Versuchsprotokoll zur sVEGFR-2-Bestimmung
- Versuchsprotokoll zur sVEGFR-3-Bestimmung

## Appendix 2a

**Versuchsprotokolle der internen SOP zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von VEGF-A, sVEGFR-2 und sVEGFR-3**

Versuchsprotokoll der internen SOP zur Bestimmung von VEGF-A in humanem Plasma mit Hilfe des QuantiGlo VEGF-A ELISA™ Kits

**1. Herstellen der Reagenzlösungen**

alle Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur bringen

 **Waschpuffer**

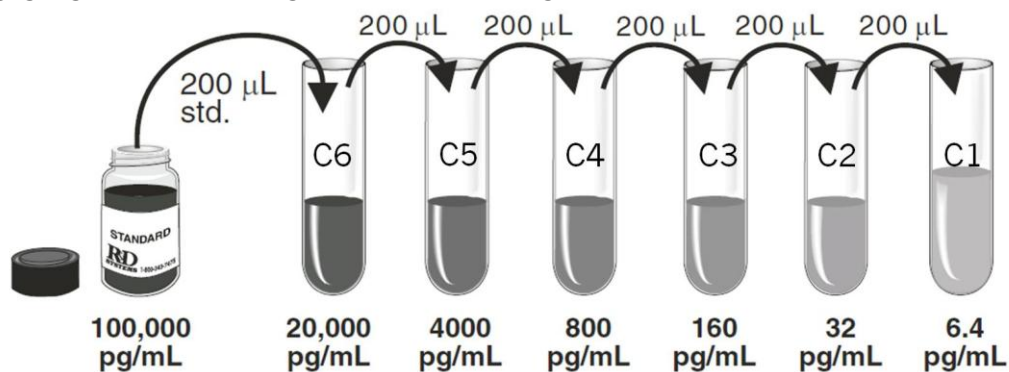
Wash Buffer Concentrate 100 mL  
PURELAB® Plus Wasser ad 1000 mL

 **Standard**

Rekonstitution mit 1 mL PURELAB® Plus Wasser  
min. 15 min leicht schwenken und dann stehen lassen

 **Kalibratoren**

Vorgegangen wird nach folgenden Schema ausgehend von dem im Kit enthaltenen Standard



Probe	Calibrator Diluent RD5L [µL]	Lösung C <sub>x+1</sub> [µL]	Konzentration [pg/mL]	
C6	800	200	20.000	
C5	800	200	4000	
C4	800	200	800	
C3	800	200	160	
C2	800	200	32	
C1	800	200	6,4	
C0		0	0	Leerprobe



Versuchsprotokoll der internen SOP zur Bestimmung von sVEGFR-2 in humanem Plasma mit Hilfe des Quantikine™ sVEGFR-2 ELISA Kits

### 1. Herstellen der Reagenzlösungen

alle Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur bringen

#### Waschpuffer

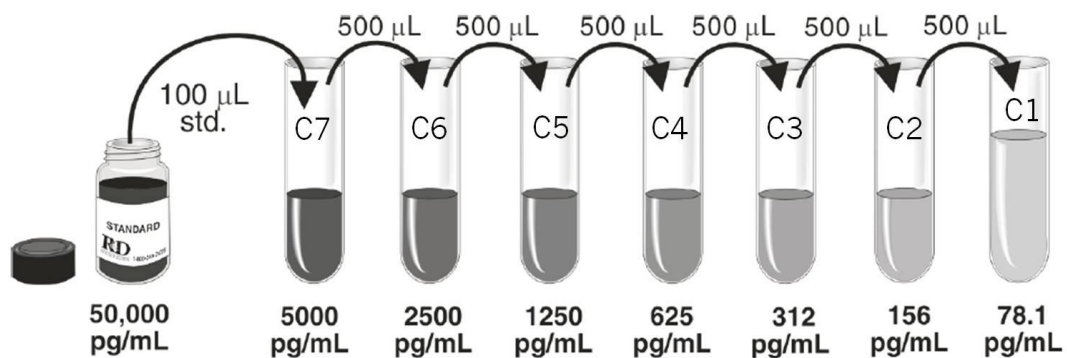
Wash Buffer Concentrate      20 mL  
PURELAB® Plus Wasser        ad 500 mL

#### VEGFR-2 Standard

Rekonstitution mit 1 mL PURELAB® Plus Wasser  
15 min unter leichtem Schütteln stehen lassen

#### Kalibratoren

Vorgegangen wird nach folgenden Schema ausgehend von dem im Kit enthaltenen Standard



Probe	Lösung C <sub>x+1</sub> [µL]	Calibrator Diluent RD6-31 [µL]	Konzentration [pg/mL]
C7	100	900	5000,0
C6	500	500	2500,0
C5	500	500	1250,0
C4	500	500	625,0
C3	500	500	312,5
C2	500	500	156,3
C1	500	500	78,1
C0		500	0,0

Leerprobe

#### Qualitätskontrollproben

unverdünnt auftragen

Probe	Konz.-Bereich [pg/mL]
QC1	216-370
QC2	1171-1920
QC3	2340-3413

**Probenherstellung**

Plasma muss 1:5 verdünnt werden

60 µL Plasma und 240 µL **Calibrator Diluent RD6-31**

**2. ELISA-Durchführung**

100 µL **Assay Diluent RD1W** in jedes Well pipettieren

100 µL Standard, QC oder Probe in die entsprechenden Wells pipettieren

mit der adhäsiven Folie abkleben

Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur

Start:

Temp.:

Ende:

Temp.:

Waschen mit Waschpuffer (4 x 400 µL)

Platte ausklopfen und nach dem letzten Schritt absaugen

200 µL **sVEGFR-2 Conjugate** in jedes Well pipettieren

mit der adhäsiven Folie abkleben

Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur

Start:

Temp.:

Ende:

Temp.:

Waschen mit Waschpuffer (4 x 400 µL)

Platte ausklopfen und nach dem letzten Schritt absaugen

200 µL **Substrate Solution** in jedes Well pipettieren

Reagenz A

10 mL

Reagenz B

10 mL

Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur

Start:

Temp.:

**Lichtschutz!!!**

Ende:

Temp.:

50 µL **Stop Solution** in jedes Well pipettieren

innerhalb von 30 min Messung der Absorption bei 450 nm und bei 570 nm zur Korrektur

Versuchsprotokoll der internen SOP zur Bestimmung von sVEGFR-3 in humanem Plasma mit Hilfe des VEGFR-3 DuoSets

### 1. Herstellen der Reagenzlösungen

alle Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur bringen

#### Waschpuffer

Wash Buffer Concentrate 20 mL  
PURELAB® Plus Wasser ad 500 mL

#### sVEGFR-3 Standard

Rekonstitution mit 1 mL PURELAB® Plus Wasser  
15 min unter leichtem Schütteln stehen lassen

#### Reagent Diluent (1:10)

Reagent Diluent Concentrate 2 5,2 mL  
PURELAB® Plus Wasser 46,8 mL

#### Kalibratoren

Begonnen wird die Verdünnungsreihe mit C7 bestehend aus 45 µL Standard und 1530 µL FKS für alle weiteren Verdünnungen  $C_x$  wird die jeweils vorherige  $C_{x+1}$  verwendet

Probe	Lösung $C_{x+1}$ [µL]	FKS* [µL]	Verdünnungs- faktor	Konzentration [pg/mL]
C7	45	1530	35	10571,4
C6	700	200	45	8222,2
C5	600	200	60	6166,7
C4	480	240	90	4111,1
C3	300	300	180	2055,6
C2	300	300	360	1027,8
C1	300	300	720	513,9
C0		250		0,0

\* inaktiviert 30 min bei 50 °C

#### Qualitätskontrollproben

Gleiches Vorgehen gilt für die Herstellung der QC-Proben, 3 QC-Proben für den Assay

Probe	Lösung $C_{x+1}$ [µL]	FKS [µL]	Verdünnungs- faktor	Konzentration [pg/mL]
<b>QC2</b>	300	300	360	1027,8
	300	300	180	2055,6
<b>QC4</b>	480	240	90	4111,1
	600	200	60	6166,7
<b>QC6</b>	700	200	45	8222,2
	45	1530	35	10571,4

**Probenvorbereitung**

Verdünnung 1:10 mit CrossDown™ Buffer

**2. Plattenvorbereitung**

1. Tag

 pH-Wert bestimmen pH: (Soll: 7,2 - 7,4)

 Sterilfiltration der PBS (Sterilfilter 0,2 µm)

 Bubble-point-Test

 100 µL Capture-Antikörper-Verdünnung in jedes Well pipettieren

4,0 µg/mL

Capture-AB

57 µL

PBS

10,2 mL

 100 µL in jedes Well pipettieren

 Inkubation über Nacht

bei Raumtemperatur (RT) in Dunkelheit

Start:

Temp:

Ende:

Temp:

2. Tag

Datum

 Waschen mit Waschpuffer

3 x mit jeweils 340 µL pro Well

ausklopfen und nach dem letzten Schritt absaugen

 300 µL Reagent Diluent in jedes Well (Reagent Diluent immer frisch herstellen)

 Inkubation für 2 h bei RT

Start:

Temp.:

Ende:

Temp.:

 Waschen mit Waschpuffer

3 x mit jeweils 340 µL pro Well

ausklopfen und nach dem letzten Schritt absaugen

**3. ELISA-Durchführung**

Datum

 100 µL Proben-Lösung in jedes Well pipettieren

 Abdecken mit Parafilm®

 Inkubation für **2 h bei 30 °C**

cave: Verdunstung!!!

Start:

Temp.:

Ende:

Temp.:

 Waschen mit Waschpuffer

3 x mit jeweils 340 µL pro Well (2x 170µL)

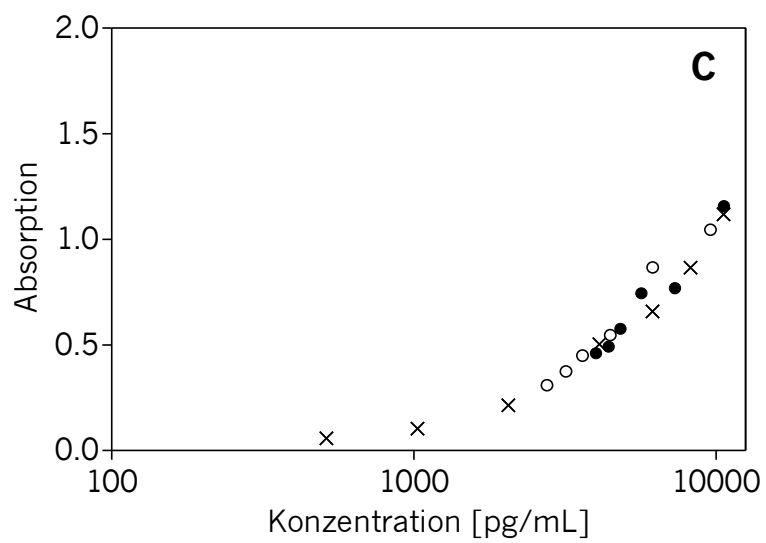
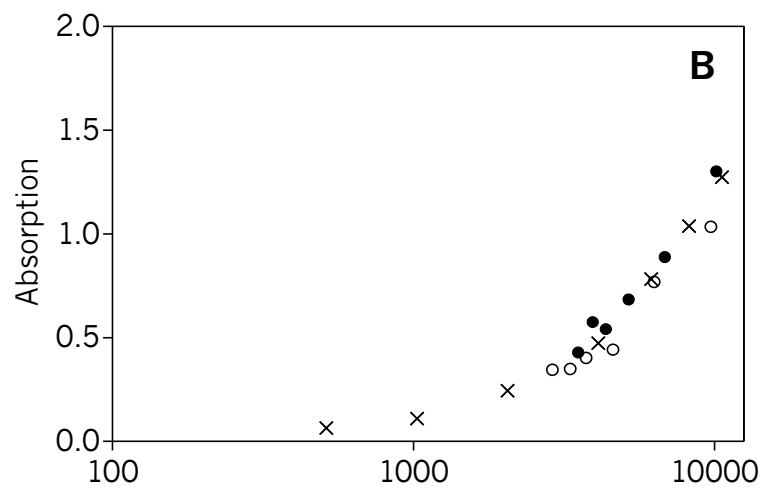
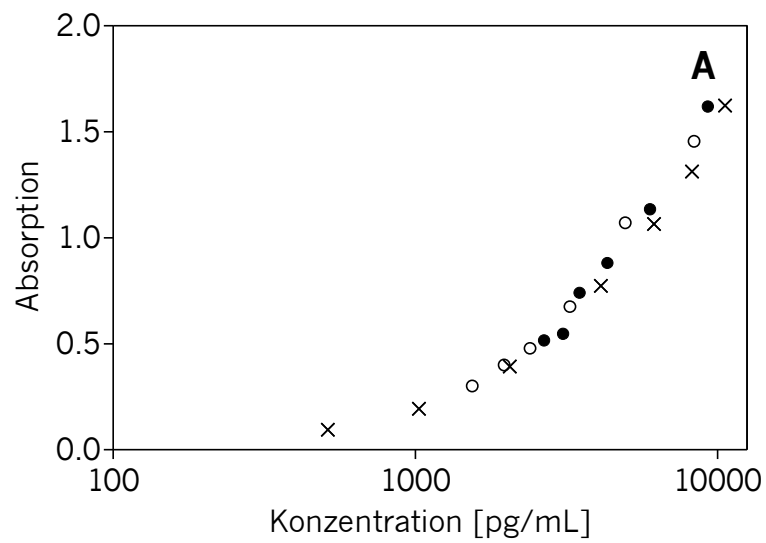
ausklopfen und nach dem letzten Schritt absaugen

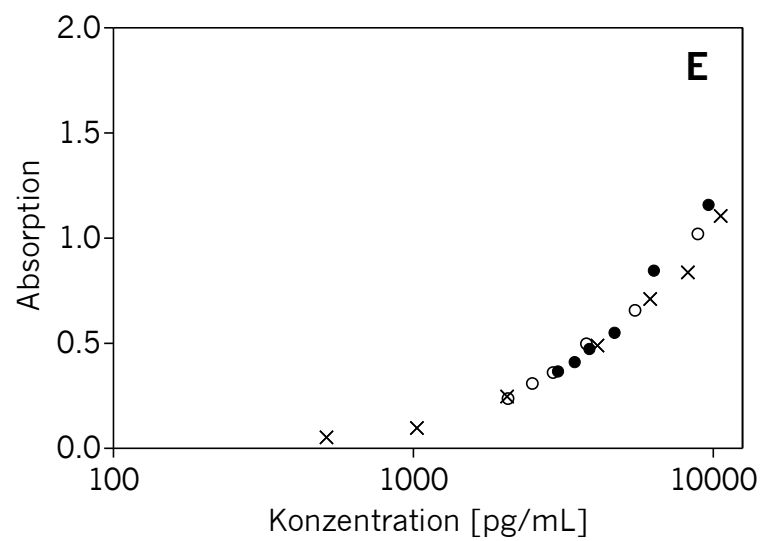
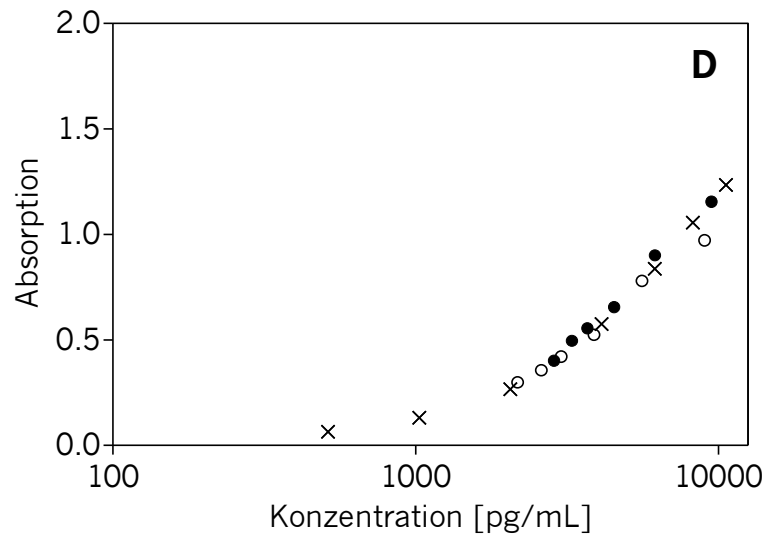




## Appendix 2b

## Validierung einer ELISA-Methode zur Quantifizierung von sVEGFR-3





Parallelität für unverdünntes, inaktiviertes FKS (x) und humanes Plasma in den Verdünnungen 1:10 (●) und 1:14 (○) angegeben als Absorption gegen die Konzentration für **A** den ersten, **B** den zweiten, **C** den dritten, **D** den vierten und **E** den fünften Validierungslauf. Alle Punkte zeigen Mittelwerte von zwei (FKS, Plasma 1:14) oder sechs (Plasma 1:10) Messungen.

FKS: fetales Kälberserum

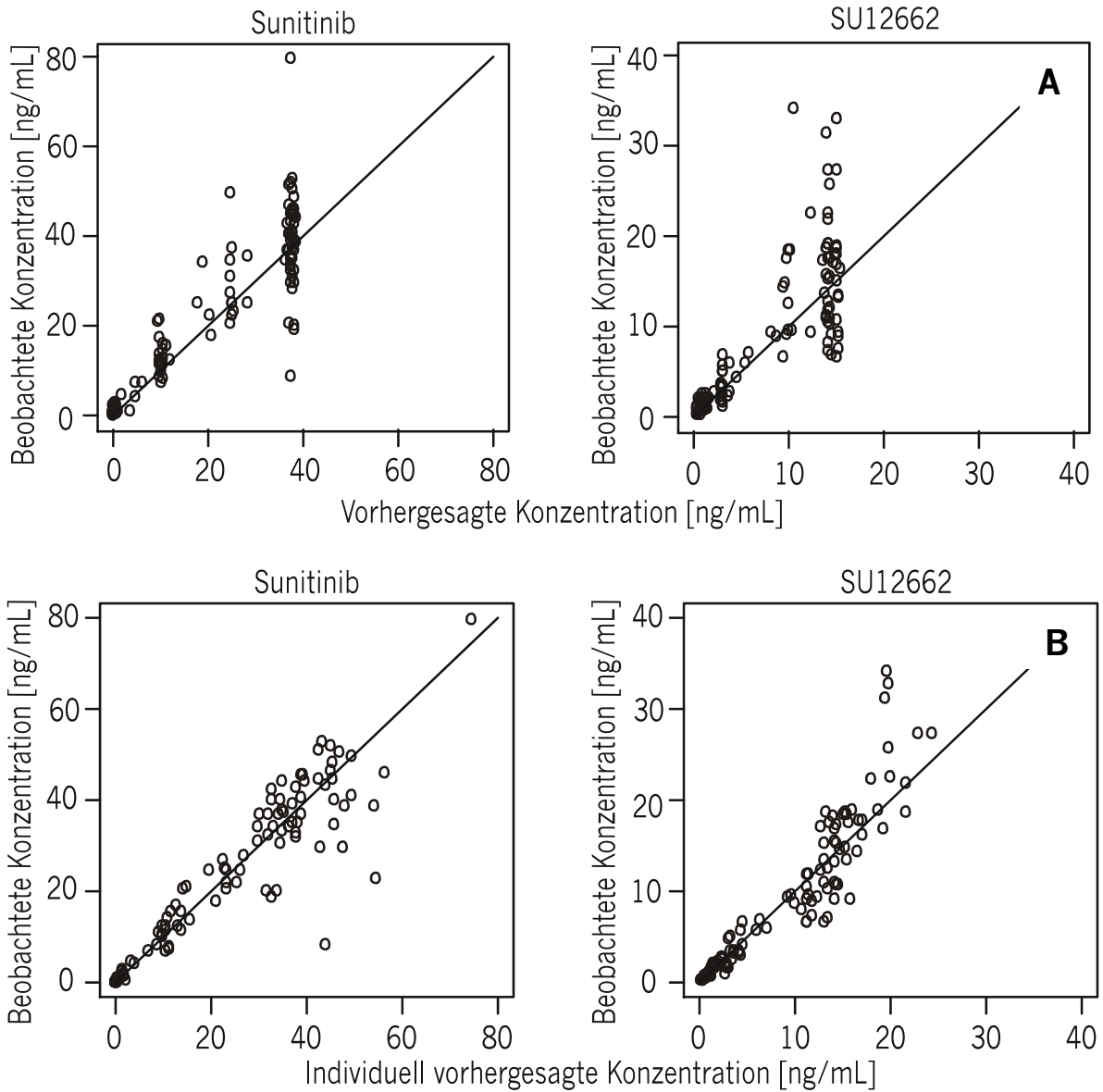
## Appendix 3

**Modellentwicklung für den Konzentrations-Zeit-Verlauf von Sunitinib und SU12662**

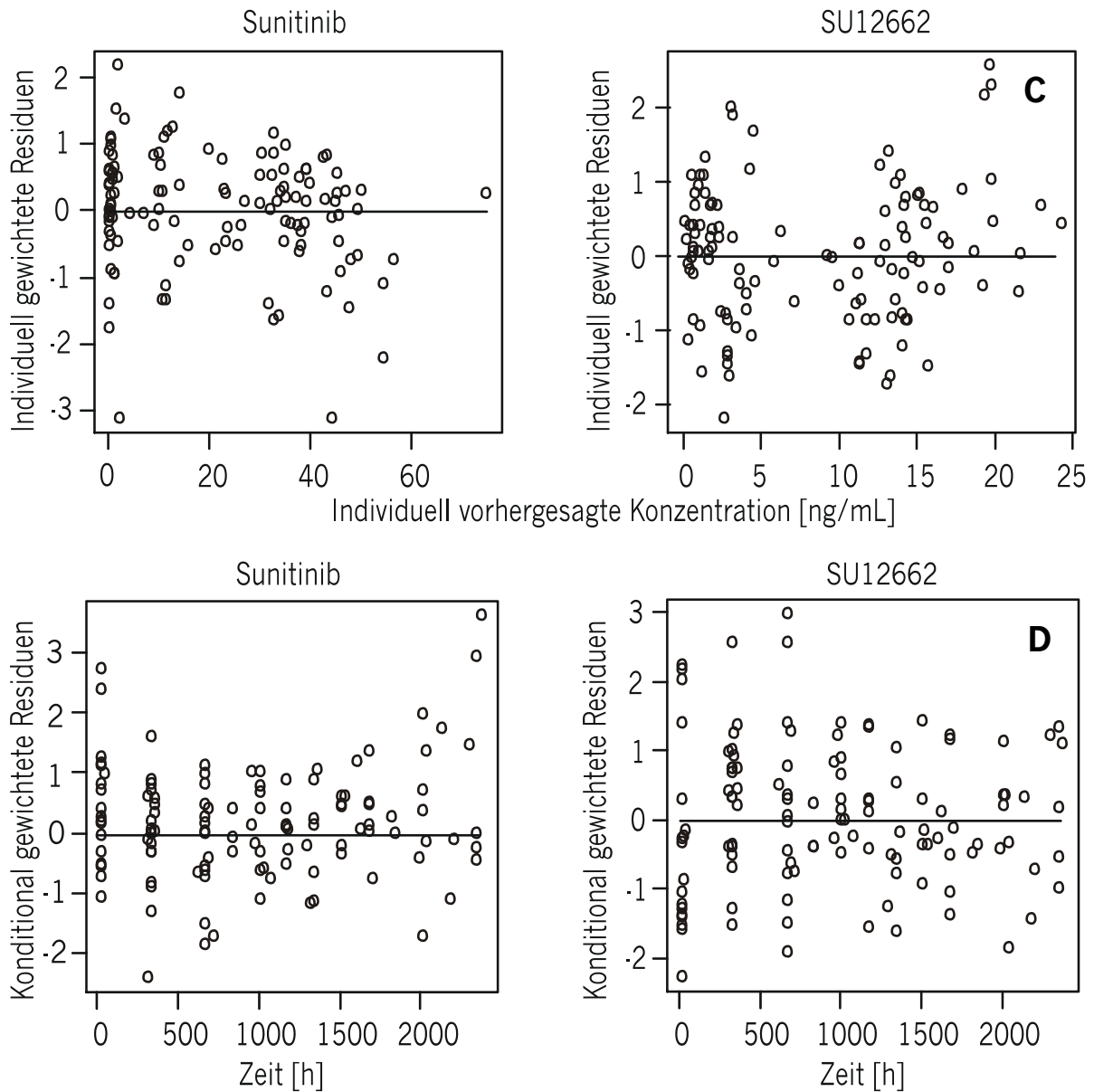
Wichtige Schritte der Modellentwicklung für das pharmakokinetische Modell von Sunitinib und SU12662

Modellparameter	Zufällige Effekte (IIV)	Residualfehler	Parameter (f/z)	OFV
<i>Strukturmodell</i>				
2-KMT <sub>Su</sub> , 1-KMT <sub>Met</sub>		proportional	9/0	903,795
2-KMT <sub>Su</sub> , 2-KMT <sub>Met</sub>		proportional	10/0	792,678
<i>Statistisches Modell</i>				
2-KMT <sub>Su</sub> , 2-KMT <sub>Met</sub>	alle	proportional	10/11	610,032
<i>Ausschluss von</i>				
2-KMT <sub>Su</sub> , 2-KMT <sub>Met</sub>	Q <sub>Met</sub>	proportional	10/10	610,163
	V <sub>2Met</sub>	proportional	10/10	609,785
	Q <sub>Su</sub>	proportional	10/10	611,962
	V <sub>2Su</sub>	proportional	10/10	611,367
	RPS	proportional	10/10	612,470
	V <sub>1Met</sub>	proportional	10/10	610,110
	V <sub>1Su</sub>	proportional	10/10	612,847
	CL <sub>Met</sub>	proportional	10/10	622,122
	CL <sub>Su</sub>	proportional	10/10	617,000
	NN	proportional	10/10	618,019
	KA	proportional	10/10	612,487
<i>Residualfehlermodell</i>				
<b>2-KMT<sub>Su</sub>, 2-KMT<sub>Met</sub></b>	<b>CL<sub>Su</sub>, CL<sub>Met</sub>, NN</b>	<b>proportional</b>	<b>10/3</b>	<b>620,098</b>
2-KMT <sub>Su</sub> , 2-KMT <sub>Met</sub>		kombiniert	12/3	620,027

IIV: Interindividuelle Variabilität; OFV: Wert der Objektiven Funktion; KMT: Kompartiment, f/z: fixierte/zufällige Effekte; Su: Sunitinib; Met: SU12662; NN: Anzahl der Transitkompartimente; RPS: Verhältnis zwischen präsystemischer und systemischer Metabolisierung; KA: Absorptionsgeschwindigkeitskonstante; CL: Clearance; V: Verteilungsvolumen; Q: interkompartimentelle Clearance; das finale Modell ist in fett dargestellt



Grafiken zur Beschreibung der Anpassungsgüte des PK-Modells für Sunitinib und SU12662. Die beobachtete Konzentration gegen **A** die vorhergesagte (PRED) und **B** gegen die individuell vorhergesagte Konzentration (IPRED).



Grafiken zur Beschreibung der Anpassungsgüte des PK-Modells für Sunitinib und SU12662. **C** Die individuell gewichteten Residuen (IWRES) gegen die individuell vorhergesagte Konzentration (IPRED) und **D** die konditional gewichteten Residuen (CWRES) gegen die Zeit.

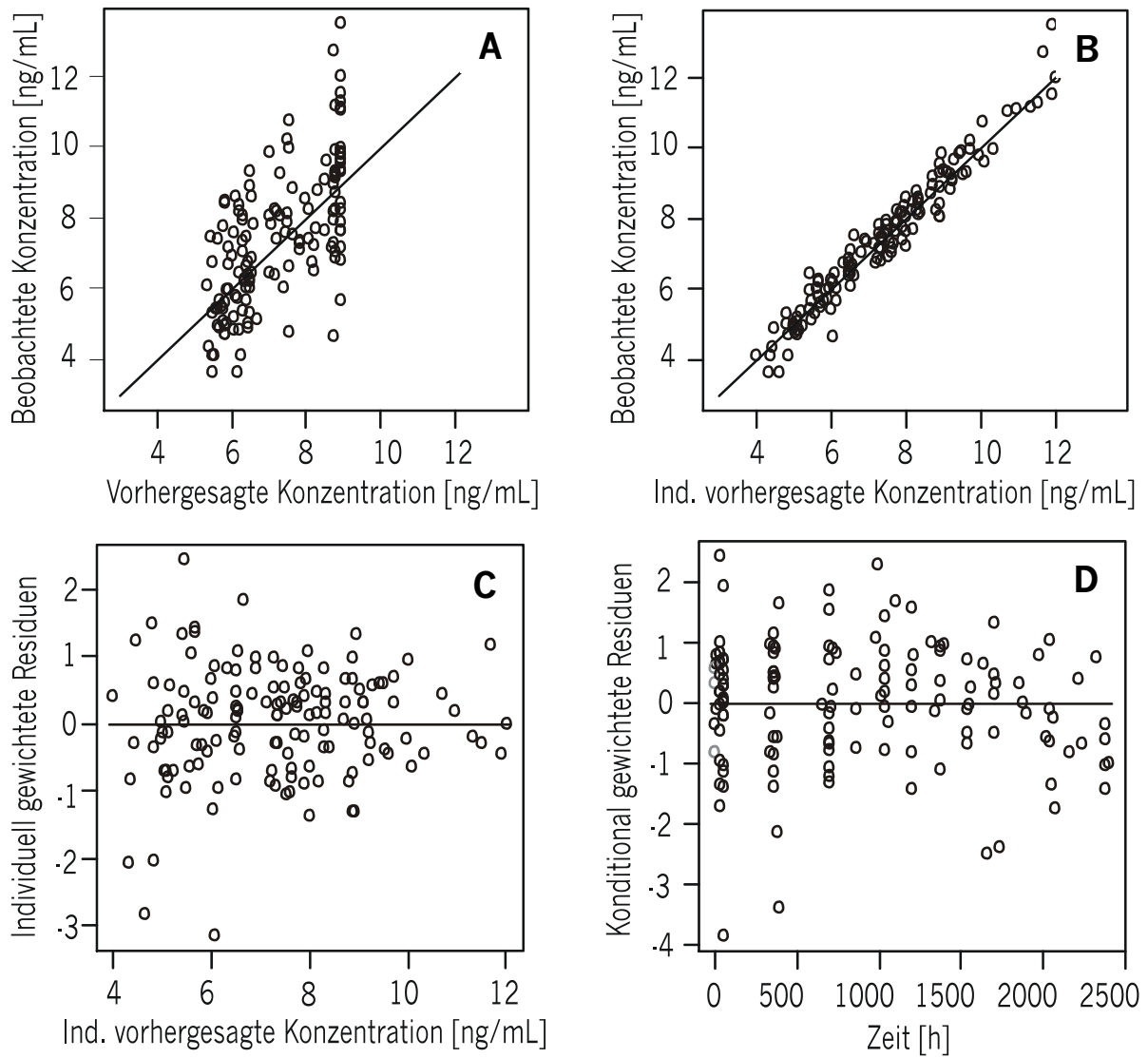
## Appendix 4

**Modellentwicklung für den Konzentrations-Zeit-Verlauf von sVEGFR-2**

Schritte der Modellentwicklung des PK/PD-Modells für sVEGFR-2

Zufällige Effekte		Residualfehler	Parameter (f/z)	OFV
IIV	IOV			
<i>Interindividuelle Variabilität</i>				
BL <sub>sVEGFR2</sub> , $\alpha_{sVEGFR2}$ , k <sub>out</sub>		proportional	4/3	2059,903
BL <sub>sVEGFR2</sub> , $\alpha_{sVEGFR2}$		proportional	4/2	2059,902
BL <sub>sVEGFR2</sub> , k <sub>out</sub>		proportional	4/2	2069,195
$\alpha_{sVEGFR2}$ , k <sub>out</sub>		proportional	4/2	2150,184
<i>Interoccasion-Variabilität</i>				
BL <sub>sVEGFR2</sub> , $\alpha_{sVEGFR2}$	k <sub>out</sub>	proportional	4/3	2059,753
BL <sub>sVEGFR2</sub> , $\alpha_{sVEGFR2}$	BL <sub>sVEGFR2</sub>	proportional	4/3	2051,015

IIV: Interindividuelle Variabilität; IOV: *Interoccasion*-Variabilität; f/z: fixierte/zufällige Effekte; OFV: Wert der Objektiven Funktion; BL: Basiswert;  $\alpha$ : intrinsische Aktivität; k<sub>out</sub>: Eliminationsrate



Grafiken zur Beschreibung der Anpassungsgüte des PK/PD-Modells für sVEGFR-2. Die beobachtete Konzentration gegen **A** die vorhergesagte (PRED) und **B** gegen die individuell vorhergesagte Konzentration (IPRED) **C** die individuell gewichteten Residuen (IWRES) gegen die individuell vorhergesagte Konzentration und **D** die konditional gewichteten Residuen (CWRES) gegen die Zeit.



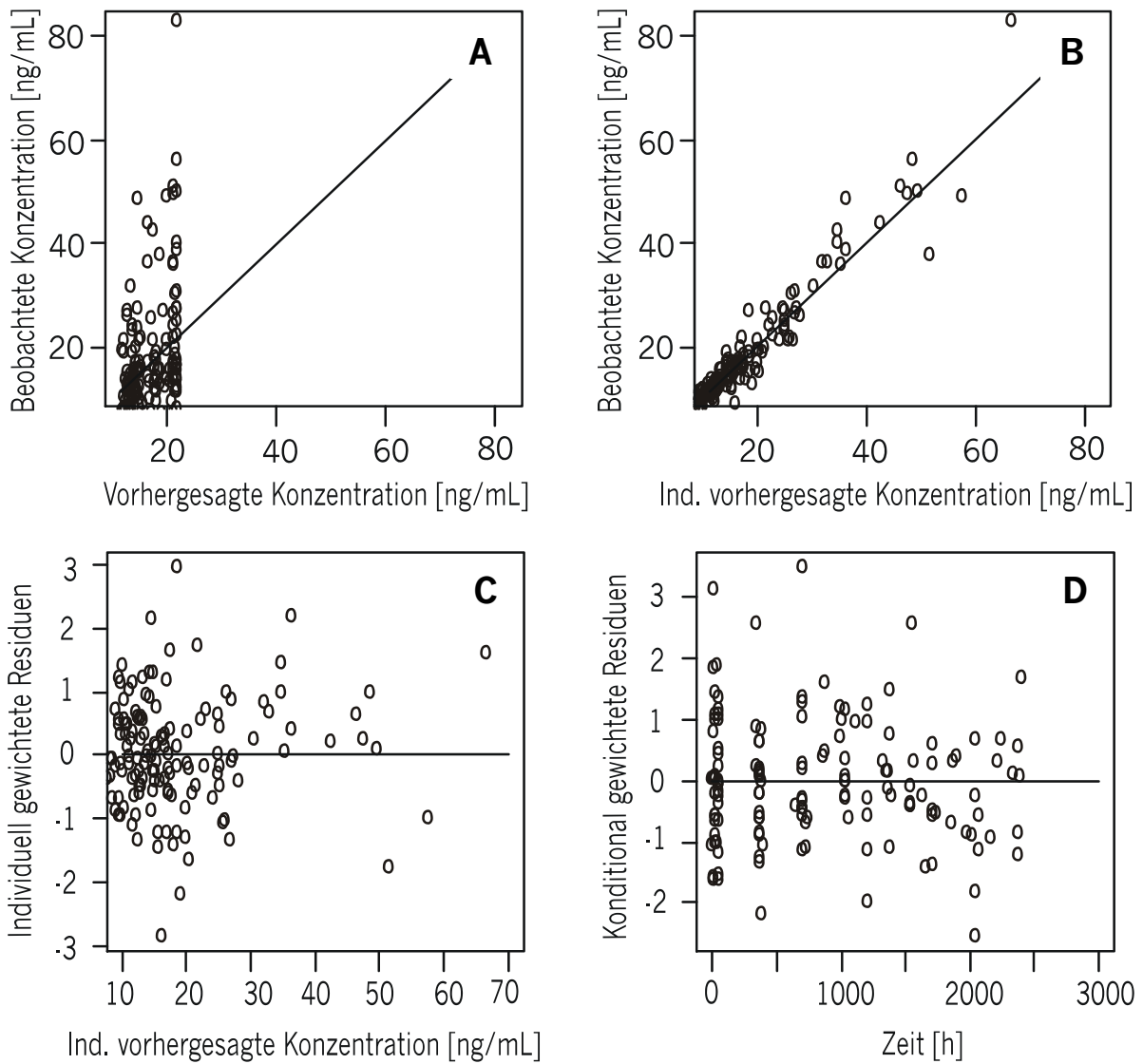
## Appendix 5

**Modellentwicklung für den Konzentrations-Zeit-Verlauf von sVEGFR-3**

Wichtige Schritte der Modellentwicklung des PK/PD-Modells für sVEGFR-3

Modellparameter	Zufällige Effekte		Residual- fehler	Parameter (f/z)	OFV
	IIV	IOV			
<i>Strukturmodell</i>					
$BL_{sVEGFR3}$	$BL_{sVEGFR3}$		prop.		
$\alpha_{sVEGFR3}, k_{out}$	$\alpha_{sVEGFR3}, k_{out}$			4/3	2457,443
$BL_{sVEGFR3}, E_{max}, k_{out}$	$BL_{sVEGFR3}, E_{max}, k_{out}$		prop.		
				4/3	2458,572
<i>Interindividuelle Variabilität</i>					
$BL_{sVEGFR3}$	$BL_{sVEGFR3}$		prop.	4/2	2459,925
$\alpha_{sVEGFR3}, k_{out}$	$\alpha_{sVEGFR3}$				
$BL_{sVEGFR3}$	$BL_{sVEGFR3}, k_{out}$		prop.	4/2	2466,218
$\alpha_{sVEGFR3}, k_{out}$					
$BL_{sVEGFR3}$	$\alpha_{sVEGFR3}, k_{out}$		prop.	4/2	2667,079
$\alpha_{sVEGFR3}, k_{out}$					
<i>Interoccasion-Variabilität</i>					
$BL_{sVEGFR3}$	$BL_{sVEGFR3}$	$BL_{sVEGFR3}$	prop.	4/3	2456,107
$\alpha_{sVEGFR3}, k_{out}$	$\alpha_{sVEGFR3}$				
$BL_{sVEGFR3}$	$BL_{sVEGFR3}$	$\alpha_{sVEGFR3}$	prop.	4/3	2458,196
$\alpha_{sVEGFR3}, k_{out}$	$\alpha_{sVEGFR3}$				

IIV: Interindividuelle Variabilität; IOV: *Interoccasion*-Variabilität; f/z: fixierte/zufällige Effekte; OFV: Wert der Objektiven Funktion; BL: Basiswert;  $\alpha$ : intrinsische Aktivität;  $k_{out}$ : Eliminationsrate; prop.: proportional



Grafiken zur Beschreibung der Anpassungsgüte des PK/PD-Modells für sVEGFR-3. Die beobachtete Konzentration gegen **A** die vorhergesagte (PRED) und **B** gegen die individuell vorhergesagte Konzentration (IPRED) **C** die individuell gewichteten Residuen (IWRES) gegen die individuell vorhergesagte Konzentration und **D** die konditional gewichteten Residuen (CWRES) gegen die Zeit.

## Appendix 6

**Optimale Probenentnahme**

Relativer Vorhersagefehler ME in % und der RMSE in % für die Bayes-Abschätzungen von  $CL_{Su}$ ,  $CL_{Met}$  und  $AAUC_{ub,0-1008h}$

Bezeichnung	Zeiten	ME, %	RMSE, %
<b><math>CL_{Su}</math></b>			
<i>4 Proben</i>			
A	24 h, 2, 4, 6 W	+1,5 (+1,1 - +1,9)	6,0
<i>3 Proben</i>			
B	24 h, 2, 4 W	+2,4 (+1,5 - +3,2)	14,2
C	24 h, 2, 6 W	+1,5 (+1,2 - +1,9)	6,1
D	24 h, 4, 6 W	+1,4 (+1,1 - +1,8)	6,0
E	2, 4, 6 W	+1,5 (+1,1 - +1,9)	6,2
<i>2 Proben</i>			
F	24 h, 2 W	+2,7 (+1,6 - +3,7)	17,1
G	24 h, 4 W	+2,0 (+1,0 - +3,0)	16,0
H	24 h, 6 W	+1,4 (+1,1 - +1,8)	6,2
I	2, 4 W	+2,3 (+1,5 - +3,2)	14,4
J	2, 6 W	+1,4 (+1,0 - +1,8)	6,3
K	4, 6 W	+1,3 (+0,9 - +1,7)	6,3
<i>1 Probe</i>			
L	24 h	+1,0 (-0,3 - +2,2)	20,3
M	2 W	+2,5 (+1,4 - +3,5)	17,2
N	4 W	+1,9 (+0,9 - +2,9)	16,5
O	6 W	+0,7 (+0,3 - +1,1)	6,4
<b><math>CL_{Met}</math></b>			
<i>4 Proben</i>			
A	24 h, 2, 4, 6 W	+1,1 (+0,5 - +1,6)	8,6
<i>3 Proben</i>			
B	24 h, 2, 4 W	+0,9 (+0,1 - +1,6)	12,1
C	24 h, 2, 6 W	+1,1 (+0,6 - +1,7)	9,1
D	24 h, 4, 6 W	+1,1 (+0,5 - +1,6)	9,0
E	2, 4, 6 W	+1,0 (+0,5 - +1,5)	8,8

Bezeichnung	Zeiten	ME, %	RMSE, %
<i>2 Proben</i>			
F	24 h, 2 W	+0,7 (-0,1 · +1,6)	13,3
G	24 h, 4 W	+0,6 (-0,2 · +1,3)	12,7
H	24 h, 6 W	+1,2 (+0,6 · +1,7)	9,7
I	2, 4 W	+0,7 (0,0 · +1,5)	12,2
J	2, 6 W	+0,9 (+0,4 · +1,5)	9,3
K	4, 6 W	+0,8 (+0,3 · +1,4)	9,2
<i>1 Probe</i>			
L	24 h	+0,1 (-0,8 · +1,0)	14,4
M	2 W	+0,5 (-0,3 · +1,3)	13,1
N	4 W	+0,3 (-0,5 · +1,1)	12,9
O	6 W	+0,3 (-0,3 · +0,9)	9,9
<b>AAUC<sub>ub,0-1008h</sub></b>			
<i>4 Proben</i>		-0,9 (-1,3 · -0,6)	6,3
A	24 h, 2, 4, 6 W		
<i>3 Proben</i>		-1,3(-1,9 · -0,8)	9,0
B	24 h, 2, 4 W	-1,2 (-1,6 · -0,7)	7,2
C	24 h, 2, 6 W	-1,2 (-1,6 · -0,7)	7,2
D	24 h, 4, 6 W	-1,1 (-1,5 · -0,7)	7,3
E	2, 4, 6 W		
<i>2 Proben</i>		-1,3 (-2,0 · -0,6)	11,4
F	24 h, 2 W	-1,0 (-1,7 · -0,4)	10,9
G	24 h, 4 W	-1,6 (-2,1 · -1,1)	8,5
H	24 h, 6 W	-1,6 (-2,2 · -1,0)	9,7
I	2, 4 W	-1,7 (-2,2 · -1,1)	8,7
J	2, 6 W	-1,7 (-2,2 · -1,1)	8,8
K	4, 6 W		
<i>1 Probe</i>		+0,5 (-0,5 · +1,4)	15,7
L	24 h	-2,0 (-2,8 · -1,3)	12,6
M	2 W	-1,8 (-2,6 · -1,1)	12,1
N	4 W	-4,1 (-4,8 · -3,4)	11,7
O	6 W		

Su: Sunitinib; Met: SU12662; CL: Clearance; AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve; AAUC: AUC der aktiven Substanz (Sunitinib und SU12662); ub: ungebunden; ME: mean prediction error; RMSE: root mean squared prediction error; W: Wochen

Relativer Vorhersagefehler ME in % und der RMSE in % für die Bayes-Abschätzungen der Basiskonzentration und der AUC<sub>0-1008h</sub> von sVEGFR-2

Zeiten	BL <sub>sVEGFR2</sub>		AUC <sub>sVEGFR2,0-1008h</sub>	
	ME, %	RMSE, %	ME, %	RMSE, %
<i>4 Proben</i>				
A 24 h, 2, 4, 6 W	+3,5 (+3,3 · +3,8)	5,2	-3,8 (-4,0 · -3,6)	5,2
<i>3 Proben</i>				
B 24 h, 2, 4 W	+5,1 (+4,8 · +5,3)	6,6	-2,5 (-2,8 · -2,3)	4,8
C 24 h, 2, 6 W	-1,2 (-1,5 · -1,0)	4,3	-9,9 (-10,2 · -9,7)	10,7
D 24 h, 4, 6 W	+1,6 (+1,3 · +1,9)	4,6	-5,7 (-5,9 · -5,4)	7,0
E 2, 4, 6 W	+11,1 (+10,8 · +11,4)	12,1	+0,9 (+0,6 · +1,1)	4,2
<i>2 Proben</i>				
F 24 h, 2 W	-1,9 (-2,2 · -1,6)	5,4	-10,5 (-10,8 · -10,2)	11,6
G 24 h, 4 W	+2,9 (+2,6 · +3,2)	5,9	-4,6 (-4,9 · -4,3)	6,7
H 24 h, 6 W	-7,7 (-8,0 · -7,4)	9,1	-17,0 (-17,3 · -16,7)	17,6
I 2, 4 W	+15,9 (+15,5 · +16,2)	16,9	+4,6 (+4,3 · +4,9)	6,8
J 2, 6 W	+5,7 (+5,3 · +6,0)	7,8	-5,2 (-5,5 · -4,9)	7,1
K 4, 6 W	+10,4 (+10,1 · +10,8)	12,0	+0,3 (0,0 · +0,7)	5,0
<i>1 Probe</i>				
L 24 h	-16,6 (-16,9 · -16,2)	17,4	-26,1 (-26,4 · -25,8)	26,6
M 2 W	+8,7 (+8,2 · +9,1)	11,4	-2,6 (-3,0 · -2,2)	7,0
N 4 W	+18,0 (+17,5 · +18,5)	19,6	+6,4 (+6,0 · +6,8)	9,3
O 6 W	-1,5 (-1,9 · -1,0)	7,4	-11,9 (-12,3 · -11,5)	13,5

W: Wochen; ME: relative mean prediction error; RMSE: root mean squared prediction error; BL: Basiswert; AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve

## Appendix 7

**Überlebenszeitanalysen**

Kovariaten als potentielle Prädiktoren für die Zeit bis zur Progression (Cox-Regression)

Parameter	Beschreibung [Einheit]
<i>Faktoren</i>	
Tumortyp	Rektum (Z = 0), Kolon (Z = 1)
Geschlecht	männlich (Z = 0), weiblich (Z = 1)
<i>Kontinuierliche Kovariaten</i>	
Alter	Lebensalter [Jahren]
Körpergewicht	Körpergewicht [kg]
Körpergröße	Körpergröße [cm]
BSA	Körperoberfläche [m <sup>2</sup> ]
5-FU	Dosis Fluorouracil [mg/m <sup>2</sup> ]
IRI	Dosis Irinotecan [mg/m <sup>2</sup> ]
<i>Pharmakokinetik</i>	
$oC_{Su,ub,336h}$	Gemessene Konzentration Sunitinib nach 312-360 h [ng/mL]
$oC_{Met,ub,336h}$	Gemessene Konzentration SU12662 nach 312-360 h [ng/mL]
$C_{Su,ub,336h}$	Abgeschätzte Konzentration Sunitinib nach 336 h [ng/mL]
$C_{Met,ub,336h}$	Abgeschätzte Konzentration SU12662 nach 336 h [ng/mL]
$C_{Su,ub,648h}$	Abgeschätzte Konzentration Sunitinib nach 648 h [ng/mL]
$C_{Met,ub,648h}$	Abgeschätzte Konzentration SU12662 nach 648 h [ng/mL]
$C_{Su,ub,672h}$	Abgeschätzte Konzentration Sunitinib nach 672 h [ng/mL]
$C_{Met,ub,672h}$	Abgeschätzte Konzentration SU12662 nach 672 h [ng/mL]
$C_{max}$	Maximale abgeschätzte Konzentration [ng/mL]
$T_{max}$	Abgeschätzte Zeit bis zur maximalen Konzentration [h]
$AUC_{ss}$	AUC der aktiven freien Substanz im Steady-State [mg·h/L]
$AAUC_{ub,336h}$	AUC der aktiven freien Substanz nach 336 h [mg·h/L]
$AAUC_{ub,648h}$	AUC der aktiven freien Substanz nach 648 h [mg·h/L]
$AAUC_{ub,672h}$	AUC der aktiven freien Substanz nach 672 h [mg·h/L]
<i>Biomarker (sVEGFR-2 und sVEGFR-3)</i>	
$oBL_{sVEGFR}$	Gemessene Biomarkerkonzentration zu Beginn [ng/L]
$oC_{sVEGFR,336h}$	Gemessene Biomarkerkonzentration nach 336 h [ng/L]
$oC_{sVEGFR/BL,336h}$	Relative Biomarkerkonzentration nach 336 h

Parameter	Beschreibung [Einheit]
$C_{sVEGFR,336h}$	Abgeschätzte Biomarkerkonzentration nach 336 h [ng/L]
$C_{sVEGFR,648h}$	Abgeschätzte Biomarkerkonzentration nach 648 h [ng/L]
$C_{sVEGFR,672h}$	Abgeschätzte Biomarkerkonzentration nach 672 h [ng/L]
$C_{sVEGFR/BL,336h}$	Abgeschätzte relative Biomarkerkonzentration nach 336 h
$C_{sVEGFR/BL,648h}$	Abgeschätzte relative Biomarkerkonzentration nach 648 h
$C_{sVEGFR/BL,672h}$	Abgeschätzte relative Biomarkerkonzentration nach 672 h
$BL_{sVEGFR}$	Abgeschätzte Basiskonzentration des Biomarkers [ng/L]
$C_{min,sVEGFR}$	Minimale abgeschätzte Biomarkerkonzentration [ng/L]
$C_{min,sVEGFR/BL}$	Minimale abgeschätzte relative Biomarkerkonzentration
$T_{min,sVEGFR}$	Zeit bis zur minimalen Biomarkerkonzentration [h]
$T_{c<0,7sVEGFR}$	Zeit, in der relative Biomarkerkonzentration unter 0,7 [h]
$T_{c<0,75sVEGFR}$	Zeit, in der relative Biomarkerkonzentration unter 0,75 [h]
$T_{c<0,8sVEGFR}$	Zeit, in der relative Biomarkerkonzentration unter 0,8 [h]
$T_{c<0,85sVEGFR}$	Zeit, in der relative Biomarkerkonzentration unter 0,85 [h]
$AUC_{sVEGFR,336h}$	Abgeschätzte AUC des Biomarkers nach 336 h [ng·h/L]
$AUC_{sVEGFR,648h}$	Abgeschätzte AUC des Biomarkers nach 648 h [ng·h/L]
$AUC_{sVEGFR,672h}$	Abgeschätzte AUC des Biomarkers nach 672 h [ng·h/L]

Su: Sunitinib; Met: SU12662; ub: ungebunden; o: beobachtet; AAUC: AUC der aktiven Substanz

#### Zeitabhängige Kovariaten als potentielle Prädiktoren der Zeit bis zur Progression

Parameter	Bedeutung [Einheit]
<i>Pharmakokinetik</i>	
<i>zeitabhängig</i>	
$AC_{ub}(t)$	Konz. der freien aktiven Substanzen zum Zeitpunkt t [ng/mL]
$AAUC_{ub}(t)$	AUC der freien aktiven Substanzen zum Zeitpunkt t [ng·h/mL]
<i>Pharmakodynamik/Biomarker</i>	
<i>zeitabhängig</i>	
$C_{sVEGFR}(t)$	Biomarkerkonzentration zum Zeitpunkt t [ng/L]
$C/BL_{sVEGFR}(t)$	relative Biomarkerkonzentration zum Zeitpunkt t
$AUC_{sVEGFR}(0-t)$	Biomarker AUC zum Zeitpunkt t [ng·h/L]
$AUC/BL_{sVEGFR}(0-t)$	$AUC_{Biomarker}$ bezogen auf den Basiswert zum Zeitpunkt t [ng·h/L]
$AUC_{C/BL_{sVEGFR}}(0-t)$	$AUC_{Biomarker}$ der relativen Konzentration zum Zeitpunkt t [h]

AC: Konzentration der aktiven Substanz; ub: ungebunden; C: Konzentration; AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve; AAUC: AUC der aktiven Substanz; BL: Basiswert

---

 Zeit bis zur Progression oder bis zum Ende der Beobachtungszeit (Zensur)

Patienten-ID	TTP [Monate]	Progression: 1 Zensur: 0
01-01	11,4	1
01-02	5,7	1
01-04	10,3	0
01-05	6,2	1
01-06	1,4	0
02-01	11,7	1
02-02	17,6	0
02-04	7,9	0
02-06	117	0
02-08	1,1	0
02-10	1,4	0
03-01	4,2	1
03-02	9,8	0
03-03	14,9	0
04-01	8,7	1
04-03	11,1	1
04-04	8,4	1
04-06	18,0	0
04-07	7,0	1
04-08	6,1	1
04-09	8,3	1

---

 TTP: Zeit bis zur Progression



Ergebnisse der univariaten Kaplan-Meier-Analyse mittels *Log-Rank-Test*

Parameter	Median	p-Wert
Tumortyp		0,1124
Geschlecht		0,2765
Alter [Jahre]	61	0,1981
Dosis <sub>5-FU</sub> [mg/m <sup>2</sup> ]	5068	0,4782
Dosis <sub>Irinotecan</sub> [mg/m <sup>2</sup> ]	325,8	0,8182
AUC <sub>SS</sub> [ng·h/mL]	1,25	0,4897
<i>sVEGFR-2</i>		
BL <sub>sVEGFR</sub> [pg/mL]	9023,6	0,9429
C <sub>min,sVEGFR</sub> [pg/mL]	5727,2	0,7403
C <sub>min,sVEGFR/BL</sub>	0,65	0,8425
T <sub>min,sVEGFR</sub> [h]	702,5	0,2602
T <sub>c&lt;0,7sVEGFR</sub> [h]	382,3	0,8452
T <sub>c&lt;0,75sVEGFR</sub> [h]	520,0	0,6988
T <sub>c&lt;0,8sVEGFR</sub> [h]	708,5	0,6988
T <sub>c&lt;0,85sVEGFR</sub> [h]	845,3	0,6988
AUC <sub>sVEGFR,648h</sub> [mg·h/L]	4,67	0,1961
AUC <sub>uBL,sVEGFR,648h</sub> [mg·h/L]	1,44	0,2533
<i>sVEGFR-3</i>		
BL <sub>sVEGFR</sub> [pg/mL]	17939	0,4506
C <sub>min,sVEGFR</sub> [pg/mL]	11763	0,4506
C <sub>min,sVEGFR/BL</sub>	0,61	0,7754
T <sub>min,sVEGFR</sub> [h]	701,1	0,4785
T <sub>c&lt;0,7sVEGFR</sub> [h]	508,8	0,7754
T <sub>c&lt;0,75sVEGFR</sub> [h]	654,5	0,7754
T <sub>c&lt;0,8sVEGFR</sub> [h]	780,6	0,7754
T <sub>c&lt;0,85sVEGFR</sub> [h]	886,8	0,6186
AUC <sub>sVEGFR,648h</sub> [mg·h/L]	9,02	0,4506
AUC <sub>uBL,sVEGFR,648h</sub> [mg·h/L]	3,77	0,8100

5-FU: Fluorouracil; AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve; SS: Steady-State;

BL: Basiswert; ub: ungebunden; uBL: unter dem Basiswert

## Ergebnisse der univariaten Cox-Regression

Marker	$\chi^2$	HR	p-Wert	Marker	$\chi^2$	HR	p-Wert
<i>Pharmakokinetik von Sunitinib und SU12662</i>							
AAUC <sub>ub,336h</sub>	0,090	0,61	0,7644	AC <sub>ub,336h</sub>	0,016	1,04	0,8995
AAUC <sub>ub,648h</sub>	0,054	1,14	0,8165	AC <sub>ub,648h</sub>	0,000	1,00	0,9904
AAUC <sub>ub,672h</sub>	0,049	1,13	0,8243	AC <sub>ub,672h</sub>	0,012	0,98	0,9133
C <sub>Su,336h</sub>	0,016	1,00	0,8978	oC <sub>Su,336h</sub>	0,002	1,00	0,9608
C <sub>Met,336h</sub>	0,254	1,04	0,6141	oC <sub>Met,336h</sub>	0,563	0,96	0,4532
C <sub>Su,648h</sub>	0,023	1,00	0,8785	AUC <sub>SS</sub>	1,207	0,26	0,2720
C <sub>Met,648h</sub>	0,032	1,01	0,8572	C <sub>max</sub>	0,402	0,81	0,5260
C <sub>Su,672h</sub>	0,056	1,00	0,8137	T <sub>max</sub>	1,193	1,00	0,2748
C <sub>Met,672h</sub>	0,005	1,00	0,9456				
<i>sVEGFR-2</i>				<i>sVEGFR-3</i>			
oBL <sub>sVEGFR2</sub>	0,047	1,00	0,8275	oBL <sub>sVEGFR3h</sub>	0,263	1,00	0,6078
oC <sub>sVEGFR2,336h</sub>	0,154	1,00	0,6948	oC <sub>sVEGFR3,336h</sub>	0,046	1,00	0,8308
oC <sub>sVR2,336h</sub> /oBL	0,131	3,09	0,7173	oC <sub>sVR3,336h</sub> /oBL	1,013	12,4	0,3142
BL <sub>sVEGFR2</sub>	0,126	1,00	0,7227	BL <sub>sVEGFR3</sub>	0,427	1,00	0,5134
C <sub>min,sVEGFR2</sub>	0,255	1,00	0,6139	C <sub>min,sVEGFR3</sub>	0,900	1,00	0,3428
C <sub>min,sVEGFR2</sub> /BL	0,068	7,08	0,7939	C <sub>min,sVEGFR3</sub> /BL	0,059	2,24	0,8086
T <sub>min,sVEGFR2</sub>	0,369	1,00	0,5438	T <sub>min,sVEGFR3</sub>	0,363	1,00	0,5471
T <sub>C&lt;0,7sVEGFR2</sub>	0,046	1,00	0,8298	T <sub>C&lt;0,7sVEGFR3</sub>	0,075	1,00	0,7836
T <sub>C&lt;0,75sVEGFR2</sub>	0,023	1,00	0,8806	T <sub>C&lt;0,75sVEGFR3</sub>	0,014	1,00	0,9060
T <sub>C&lt;0,8sVEGFR2</sub>	0,013	1,00	0,9102	T <sub>C&lt;0,8sVEGFR3</sub>	0,009	1,00	0,9261
T <sub>C&lt;0,85sVEGFR2</sub>	0,142	1,00	0,7064	T <sub>C&lt;0,85sVEGFR3</sub>	0,002	1,00	0,9684
C <sub>sVEGFR2,336h</sub>	0,350	1,00	0,5540	C <sub>sVEGFR3,336h</sub>	0,611	1,00	0,4344
C <sub>sVEGFR2,648h</sub>	0,065	1,00	0,7981	C <sub>sVEGFR3,648h</sub>	1,175	1,00	0,2784
C <sub>sVEGFR2,672h</sub>	0,073	1,00	0,7872	C <sub>sVEGFR3,672h</sub>	1,156	1,00	0,2822

Marker	$\chi^2$	HR	p-Wert	Marker	$\chi^2$	HR	p-Wert
C <sub>s</sub> VEGFR <sub>2,336h</sub> /BL	1,043	n.b.	0,3072	C <sub>s</sub> VEGFR <sub>3,336h</sub> /BL	0,315	10,8	0,5749
C <sub>s</sub> VEGFR <sub>2,648h</sub> /BL	0,238	0,14	0,6258	C <sub>s</sub> VEGFR <sub>3,648h</sub> /BL	0,050	0,55	0,8224
C <sub>s</sub> VEGFR <sub>2,672h</sub> /BL	0,217	0,13	0,6412	C <sub>s</sub> VEGFR <sub>3,672h</sub> /BL	0,048	0,57	0,8270
AUC <sub>s</sub> VEGFR <sub>2,336h</sub>	0,003	1,00	0,9590	AUC <sub>s</sub> VEGFR <sub>3,336h</sub>	0,620	1,00	0,4312
AUC <sub>s</sub> VEGFR <sub>2,648h</sub>	0,052	1,00	0,8199	AUC <sub>s</sub> VEGFR <sub>3,648h</sub>	0,748	1,00	0,3872
AUC <sub>s</sub> VEGFR <sub>2,672h</sub>	0,053	1,00	0,8185	AUC <sub>s</sub> VEGFR <sub>3,672h</sub>	0,762	1,00	0,3828
<i>Andere</i>							
Tumortyp	2,345	2,58	0,1257	Geschlecht	1,147	1,91	0,2842
<b>Alter</b>	<b>10,651</b>	<b>0,87</b>	<b>0,0011</b>	Dosis <sub>5-FU</sub>	0,231	1,00	0,6306
Körpergewicht	1,948	0,97	0,1628	Dosis <sub>Irinotecan</sub>	0,627	0,99	0,4284
Körpergröße	0,721	0,97	0,3958	BSA	1,554	0,12	0,2126

HR: Hazard-Ratio; ub: ungebunden; Su: Sunitinib; Met: SU12662; o: beobachtet/gemessen; BSA: Körperoberfläche; AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve; AAUC: AUC der aktiven Substanz; C: Konzentration; AC: Konzentration der aktiven Substanz; BL: Basiswert

## Schritte der Modellentwicklung des PK/PD/Progressionszeit-Modells

Parameter	Kovariaten	OFV	Parameter	Kovariaten	OFV
$BL_{\text{Hazard}}$		228,686	<i>Einschluss von</i>	$AC_{\text{ub}}$	
<i>Pharmakokinetik</i>					
<b><math>BL_{\text{Hazard}}, \beta</math></b>	<b><math>AC_{\text{ub}}</math></b>	<b>222,549</b>			
	$AUC_{\text{SS}}$	224,021			
<i>sVEGFR-2</i>					
$BL_{\text{Hazard}}, \beta$	$BL_{\text{Hazard}}, \beta$		$BL_{\text{Hazard}}, \beta, \gamma$	$AUC_{\text{sVEGFR2}}$	222,172
	$C_{\text{sVEGFR2}}/BL$	227,842		$C_{\text{sVEGFR2}}/BL$	220,514
	$C_{\text{sVEGFR2}}$	228,271		$C_{\text{sVEGFR2}}$	221,893
	$AUC_{\text{sVEGFR2}}$	225,819		$AUC_{\text{sVEGFR2}}/BL$	222,311
	$AUC/BL_{\text{sVEGFR2}}$	226,113		$AUC_{\text{sVEGFR2}}/BL$	222,308
	$AUC_{\text{sVEGFR2}}/BL$	226,106		$BL_{\text{sVEGFR2}}$	222,498
	$BL_{\text{sVEGFR2}}$	228,686		$C_{\text{min,sVEGFR2}}$	222,279
	$C_{\text{min,sVEGFR2}}$	228,670		$T_{\text{min,sVEGFR2}}$	222,020
	$T_{\text{min,sVEGFR2}}$	227,445		$AUC_{\text{sVEGFR2,cyc1}}$	222,549
	$AUC_{\text{sVEGFR2,cyc1}}$	228,686		$T_{C<0,7\text{sVEGFR2}}$	222,235
	$T_{C<0,7\text{sVEGFR2}}$	228,629		$T_{C<0,75\text{sVEGFR2}}$	222,061
	$T_{C<0,75\text{sVEGFR2}}$	228,638		$T_{C<0,8\text{sVEGFR2}}$	222,284
	$T_{C<0,8\text{sVEGFR2}}$	228,660		$T_{C<0,85\text{sVEGFR2}}$	222,433
	$T_{C<0,85\text{sVEGFR2}}$	228,475			
<i>sVEGFR-3</i>					
$BL_{\text{Hazard}}, \beta$	$C_{\text{sVEGFR3}}/BL$	227,967	$BL_{\text{Hazard}}, \beta, \gamma$	$C_{\text{sVEGFR3}}/BL$	220,211
	$C_{\text{sVEGFR3}}$	228,401		$C_{\text{sVEGFR3}}$	221,160
	$AUC_{\text{sVEGFR3}}$	228,002		$AUC_{\text{sVEGFR3}}$	222,256
	$AUC/BL_{\text{sVEGFR3}}$	226,436		$AUC_{\text{sVEGFR3}}/BL$	222,526
	$AUC_{\text{sVEGFR3}}/BL$	226,436		$AUC_{\text{sVEGFR3}}/BL$	222,415
	$BL_{\text{sVEGFR3}}$	228,408		$BL_{\text{sVEGFR3}}$	222,415
	$C_{\text{min,sVEGFR3}}$	227,949		$C_{\text{min,sVEGFR3}}$	221,998
	$T_{\text{min,sVEGFR3}}$	227,441		$T_{\text{min,sVEGFR3}}$	222,008
	$T_{C<0,7\text{sVEGFR3}}$	228,675		$T_{C<0,7\text{sVEGFR3}}$	222,549
	$T_{C<0,75\text{sVEGFR3}}$	228,609		$T_{C<0,75\text{sVEGFR3}}$	222,549
	$T_{C<0,8\text{sVEGFR3}}$	228,340		$T_{C<0,8\text{sVEGFR3}}$	222,549
	$T_{C<0,85\text{sVEGFR3}}$	228,294		$T_{C<0,85\text{sVEGFR3}}$	222,549

Parameter	Kovariaten	OFV
<i>Tumor</i>		
BL <sub>Hazard</sub> , $\beta$	Tumor <sub>BL</sub>	228,165
	Tumortyp	227,465

OFV: Wert der Objektiven Funktion; BL<sub>Hazard</sub>: Basishazard-Funktion;  $\beta$ ,  $\gamma$ : Logarithmus der Hazard-Ratio für die jeweiligen Kovariaten; AUC: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve; BL: Basiswert; C: Konzentration; AC: Konzentration der aktiven Substanz; SS: Steady-State

Patientencharakteristika zweier Vergleichsstudien zur Beurteilung der Wirksamkeit der Sunitinibtherapie in Kombination mit Folinat, Fluorouracil und Irinotecan

	NCT00457691		NCT00668863
	FOLFIRI +Sunitinib	FOLFIRI +Placebo	FOLFIRI +Sunitinib
Anzahl an Patienten	386	382	71
Alter [Jahre] MW $\pm$ SD	58,6 $\pm$ 10,36	57,6 $\pm$ 10,77	$\leq$ 44 Jahre: 6 45 - 64 Jahre: 44 > 65 Jahre: 21
Geschlecht (m/w)	164/222	179/203	42/29

FOLFIRI: Folinat, Fluorouracil, Irinotecan; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; m: männlich; w: weiblich

## Appendix 8

## NONMEN-Codes

## Pharmakokinetisches Modell Sunitinib und SU12662

```

$PROBLEM PK_CESAR C-II-005
;EINHEITEN
;Zeit      - Stunden
;Dosis     - µg
;Konz     - ng/mL → µg/L
;LLOQ     - 0,06 ng/mL
;CL       - L/h
;Volumen  - L

$INPUT ID SID OID STIME TIME AMT DV EVID D1M2 CMT OCC CYC AGE BW HGT M1F2
$DATA ...cesar_101201dose428pat.csv
;IGNORE (ID.EQ.13,STIME.EQ.1872) IM DATENSATZ
;IGNORE (ID.EQ.15,STIME.EQ.1944) IM DATENSATZ

$ABBREVIATED COMRES=2

$SUBROUTINE ADVAN6 TOL=4

$MODEL
NCOMP=6
COMP=(DEPOTD)
COMP=(CENTRAL)
COMP=(PERIPH)
COMP=(METZ)
COMP=(METP)
COMP=(FAUC)

$THETA
(0,38.1)      ;1 THCL/F  - CLEARANCE SUNITINIB
(0,3090)     ;2 THV1/F  - ZENTRALES VERTEILUNGSVOLUMEN SUNITINIB
(0,643)      ;3 THV2/F  - PERIPHERAL VERTEILUNGSVOLUMEN SUNITINIB
(0,0.467)    ;4 THQ/F  - INTERCOMPARTIMENTELLE CLEARANCE SUNITINIB
(0.54 FIX)   ;5 THKA   - ARBSORPTIONRATE
(1.48 FIX)   ;6 THMTT  - MITTLERE TRANSITZEIT
(1.46 FIX)   ;7 THNN   - ANZAHL DER TRANSITKOMPARTIMENTE
(1.91 FIX)   ;8 THRFP  - RATIO PRESYSTEMISCH/SYSTEMISCHER METABOLISMUS
(0.21 FIX)   ;9 THFM   - FRAKTION METABOLISIERT ZU SU12662
(1 FIX)      ;10 THFABS - FRAKTION DER DOSIS ABSORBIERT
(0,20.6)    ;11 THCLM  - CLEARANCE VOM SU12662
(0,1680)    ;12 THVM1  - ZENTRALES VERTEILUNGSVOLUMEN SU12662
(0,684)     ;13 THVM2  - PERIPHERES VERTEILUNGSVOLUMEN SU12662
(0,2.39)    ;14 THQ2   - INTERKOMPARTIMENTELLE CLEARANCE SU12662
(0,0.259)   ;15 CV_PAR - PROPORTIONALER FEHLER SUNITINIB
(0,0.286)   ;16 CV_MET - PROPORTIONALER FFEHLER SU12662

$OMEGA 0.0406 ;1 ETA_CL
$OMEGA 0 FIX   ;2 ETA_V1
$OMEGA 0.0233 ;3 ETA_CLM
$OMEGA 0 FIX   ;4 ETA_VM1
$OMEGA 0 FIX   ;5 ETA_MTT
$OMEGA 0 FIX   ;6 ETA_RFP
$OMEGA 2.67   ;7 ETA_NN
$OMEGA 0 FIX   ;8 ETA_KA
$OMEGA 0 FIX   ;9 ETA_V2
$OMEGA 0 FIX   ;10 ETA_Q
$OMEGA 0 FIX   ;11 ETA_FM
$OMEGA 0 FIX   ;12 ETA_FABS
$OMEGA 0 FIX   ;13 ETA_VM2
$OMEGA 0 FIX   ;14 ETA_Q2

$SIGMA 1 FIX

```

```

$PK
" FIRST
" USE PRCOM_INT, ONLY: MITER, METH, IMAX, ISTFLG, INTFLG
" MAIN
" IMAX=200000000

; LOGIT ERROR OF FM
LOGI = EXP( LOG( THETA(9) / (1-THETA(9)) ) + ETA(11) )
FM = LOGI / (1+LOGI)
RFP = TVRFP * EXP( ETA(6) )
SQ = SQRT( 1 + 2 * RFP + RFP**2 - 4 * RFP * FM )
FFP = 0.5 + 0.5 * RFP - 0.5 * SQ
FSY = FFP / RFP
FABS = THETA(10) * EXP( ETA(12) ) ; ABSORBIERTE MENGE DER DOSIS
FD = (1-FFP) * FABS ; BIOVERFÜGBARKEIT
FMAB = FABS * FM ; FRAKTION ABSORBIERTER DOSIS AN SU12662

; TYPISCHE WERTE
TVCL = FD * THETA(1)
TVV1 = FD * THETA(2)
TVV2 = FD * THETA(3)
TVQ = FD * THETA(4)
TVKA = THETA(5)
TVMTT = THETA(6)
TVNN = THETA(7)
TVRFP = THETA(8)
TVCLM = THETA(11)
TVVM1 = THETA(12)
TVVM2 = THETA(13)
TVQ2 = THETA(14)

; STATISTISCHES MODELL
CL = TVCL * EXP( ETA(1) )
V1 = TVV1 * EXP( ETA(2) )
V2 = TVV2 * EXP( ETA(9) )
Q = TVQ * EXP( ETA(10) )
KA = TVKA * EXP( ETA(8) )
CLM = TVCLM * EXP( ETA(3) )
VM1 = TVVM1 * EXP( ETA(4) )
VM2 = TVVM2 * EXP( ETA(13) )
Q2 = TVQ2 * EXP( ETA(14) )
MTT = TVMTT * EXP( ETA(5) )

IF( MTT.LT.0.001) MTT=0.001

NN = TVNN * EXP( ETA(7) )
KTR = (NN+1) / MTT ; TRANSITRATE

S2=V1
S3=V2
S4=VM1
S5=VM2

IF( NEWIND.NE.2) THEN ; RESET TDOS UND PD FÜR JEDES INDIVIDUUM
TDOS=0
PD=0
ENDIF

; DOSISZEITPUNKT
IF( AMT.GT.0) TDOS=TIME
IF( AMT.GT.0.AND.CMT.EQ.1) PD=AMT * FABS
TAD=TIME-TDOS ; ZEIT RELATIV ZUR DOSIS

F1=0

; STERLING APPROXIMATION OF FACULTY NN Savic et al, 2007
L=LOG( 2.5066 ) + (NN+.5) * LOG( NN ) - NN

; EXPOSITION DER UNGEBUNDENEN AKTIVEN SUBSTANZ IM STEADY-STATE
AUC_SS = (1-FFP) * DOSE / CL + FFP * DOSE / CLM

```

```

;RESET FÜR JEDES INDIVIDUUM ZUR BERECHNUNG VON CMAX UND TMAX
IF(NEWIND.LE.1) THEN
  COM(1)= 0
  COM(2)= 0
ENDIF

$DES
X=0.00001                ;VERMEIDEN VON LOGARITHMUS 0

;MEHRFACHDOSIERUNG
;TRANSITKOMPARTIMENTMODELL
IF(T.GE.TDOS) THEN
DADT(1)=EXP(LOG(PD+X)+LOG(KTR+X)+NN*LOG(KTR*(T-TDOS)+X)-KTR*(T-TDOS)-L)-(1-
FFP)*KA*A(1)-(FFP)*KA*A(1)
ELSE
DADT(1)=EXP(LOG(PD+X)+LOG(KTR+X)+NN*LOG(KTR*T +X)-KTR*T-L)-(1-FFP)*KA*A(1)-
(FFP)*KA*A(1)
ENDIF
;ZENTRALES KOMPARTIMENT SUNITINIB
DADT(2)=(1-FFP)*KA*A(1)-Q/V1*A(2)+Q/V2*A(3)-CL/V1*A(2)
;PERIPHERES KOMPARTIMENT SUNITINIB
DADT(3)=Q/V1*A(2)-Q/V2*A(3)

;ZENTRALES KOMPARTIMENT SU12662
DADT(4)=FFP*KA*A(1)+CL/V1*A(2)*FSY-CLM/VM1*A(4)-Q2/VM1*A(4)+Q2/VM2*A(5)
;PERIPHERES KOMPARTIMENT SU12662
DADT(5)=Q2/VM1*A(4)-Q2/VM2*A(5)

;UNGEBUNDENE SUBSTANZKONZENTRATION 95% PB SUNITINIB, 90% PB SU12662
FC= A(4)/VM1*(1-0.90)+A(2)/V1*(1-0.95)

;AUC DER UNGEBUNDENEN AKTIVEN SUBSTANZ
DADT(6)=FC

;TMax UND CMax ZYKLUS 1
CT=FC
IF(CT.GT.COM(1).AND.CYC.EQ.1) THEN ;MAXIMUM IN ZYKLUS 1
  COM(1)=CT
  COM(2)=T
ENDIF

$ERROR
AUC = A(6)
CMAX = COM(1)
TMAX = COM(2)

IF(D1M2.EQ.1) THEN
  IPRE = A(2)/V1
  IRES = DV - IPRE
  W = THETA(15)*IPRE          ;PROPORTIONALES FEHLERMODELL
  Y = IPRE+ERR(1)*W
ELSE
  IPRE = A(4)/VM1
  IRES = DV - IPRE
  W = THETA(16)*IPRE
  Y = IPRE+ERR(1)*W
ENDIF

DEL = 0
IF(W.EQ.0) DEL = 1
IWRE = IRES/(W+DEL)

$ESTIMATION SIG=2 SIGL=6 PRINT=1 METHOD=1 INTER MAXEVAL=9999 NOABORT
$COVARIANCE MATRIX=S PRINT=E

```



## PK/PD-Modell sVEGFR-2

```
$PROBLEM VEGFR2_CESAR C-II-005
;EINHEITEN
;Zeit      - h
;Dosis     - µg
;CP        - ng/mL -> µg/L
;LLOQ     - 0.06 ng/mL
;CL        - L/h
;Volumen  - L
;sVEGFR-2 - pg/mL

$INPUT ID STIM TIME AMT DV EVID CMT CYC AGE BW HGT M1F2 KA=DROP MTTx NNx
RFPx CLx V1x Q=DROP V2=DROP CLMx VM1x VM2=DROP Q2=DROP

$DATA cesar_sVEGFR2_180911_sim.csv

$SUBROUTINE ADVAN6 TOL=4

$MODEL
NCOMP=7
COMP=(DEPOTD,DEFDOSE)
COMP=(CENTRAL)
COMP=(PERIPH)
COMP=(METC)
COMP=(METP)
COMP=(VEGFR2)
COMP=(AUCV2)

$THETA
(0,8950)      ;1 THBLV2  - Basiswert sVEGFR-2
(0,1.26)     ;2 THalfa  - intrinsische Aktivität
(0,0.00478)  ;3 THKOUT  - Kout
(4 FIX)      ;4 THKD    - Dissoziationskonstante Mena et al. 2010
(0,0.0744)   ;5 CV      - Proportionaler Fehler

$OMEGA 0.0276 ;1 ETA_BLVR2
$OMEGA 0.0202 ;2 ETA_ALFA
$OMEGA 0 FIX  ;3 ETA_KOUT
$OMEGA 0 FIX  ;4 ETA_KD

$OMEGA BLOCK(1) 0.00453 ;5 KP_IOV1
$OMEGA BLOCK(1) SAME ;6 KP_IOV2

$SIGMA 1 FIX

$PK
" FIRST
" USE PRCOM_INT,ONLY:MITER,METH,IMAX,ISTFLG,INTFLG
" MAIN
" IMAX=200000000

;INTEROCCASION VARIABILITÄT - ZYKLUS
OCC1=0
OCC2=0
IF(CYC.EQ.1) OCC1=1
IF(CYC.EQ.2) OCC2=1

IOV=OCC1*ETA(5)+OCC2*ETA(6)

;PHARMAKODYNAMIK
;System spezifisch
TVBLV2 = THETA(1)
BLV2   = TVBLV2*EXP(ETA(1)+IOV)
TVALFA = THETA(2)
ALFA   = TVALFA*EXP(ETA(2))
TVKOUT = THETA(3)
KOUT   = TVKOUT*EXP(ETA(3))
```

```

;Substanz spezifisch
TVKD = THETA(4)
KD = TVKD*EXP(ETA(4))

;PHARMAKOKINETIK
FM = 0.21
RFP = RFPx

SQ = SQRT(1+2*RFP+RFP**2-4*RFP*FM)
FFP = 0.5+0.5*RFP-0.5*SQ ;FRAKTION FIRST-PASS METABOLISIERT
FSY = FFP/RFP ;FRAKTION SYSTEMISCH METABOLISIERT

FABS= 1
FD = (1-FFP)*FABS ;BIOVERFÜGBARKEIT
FMAB= FABS*FM ;FRAKTION ABSORBIERTER DOSIS AN SU12662
KA = 0.54 ;TYPISCHER WERT FÜR KA
CL = CLx
V1 = V1x
V2 = 550.11 ;TYPISCHER WERT FÜR V2
Q = 0.4 ;TYPISCHER WERT FÜR Q
CLM = CLMx
VM1 = VM1x
VM2 = 683.83 ;TYPISCHER WERT FÜR VM2
Q2 = 2.39 ;TYPISCHER WERT FÜR Q2

MTT = MTTx
NN = NNx
KTR = (NN+1)/MTT ;TRANSITRATE

S2=V1
S3=V2
S4=VM1
S5=VM2

;DOSIS
IF(NEWIND.NE.2) THEN ;RESETS TDOS UND PD FÜR JEDES INDIVIDUUM
  TDOS=0
  ON=0
  PD=0
ENDIF

;ZEIT NACH DER DOSIERUNG
IF(AMT.GT.0) THEN
  TDOS=TIME
  ON=1
  PD=AMT*FABS
ENDIF
TAD=TIME-TDOS ;ZEIT RELATIV ZUR DOSIS

F1=0
;STERLING APPROXIMATION OF FACULTY NN Savic et al, 2007
L=LOG(2.5066)+(NN+0.5)*LOG(NN)-NN
;INITIALWERT
A_0(6)=BLV2
KIN = BLV2*KOUT

$DES
X=0.00001 ;VERMEIDEN VON LOGARITHMUS 0

;MEHRFACHDOSIERUNG
IF(T.GE.TDOS) THEN
  DADT(1)=ON*EXP(LOG(PD+X)+LOG(KTR+X)+NN*LOG(KTR*(T-TDOS)+X)-KTR*(T-TDOS)-
  L)-(1-FFP)*KA*A(1)-(FFP)*KA*A(1)
ELSE
  DADT(1)=ON*EXP(LOG(PD+X)+LOG(KTR+X)+NN*LOG(KTR*T+X)-KTR*T-L)-(1-
  FFP)*KA*A(1)-(FFP)*KA*A(1)
ENDIF
;ZENTRALES KOMPARTIMENT SUNITINIB
DADT(2)=(1-FFP)*KA*A(1)-Q/V1*A(2)+Q/V2*A(3)-CL/V1*A(2)
;PERIPHERES KOMPARTIMENT SUNITINIB
DADT(3)=Q/V1*A(2)-Q/V2*A(3)

```

```
;ZENTRALES KOMPARTIMENT SU12662
DADT(4)=FFP*KA*A(1)+CL/V1*A(2)*FSY-CLM/VM1*A(4)-Q2/VM1*A(4)+Q2/VM2*A(5)
;PERIPHERES KOMPARTIMENT SU12662
DADT(5)=Q2/VM1*A(4)-Q2/VM2*A(5)

;TOTALE PLASMAKONZENTRATION AN SUBSTANZ
C = A(4)/VM1+A(2)/V1
;UNGEBINDENE AKTIVE KONZENTRATION 95% PB SUNITINIB 90% PB SU12662
FC= A(4)/VM1*(1-0.90)+A(2)/V1*(1-0.95)

;VEGFR2
;KINASE-BINDUNGS
IF(FC.LE.0) THEN
  BND=0
ELSE
  BND=FC/(KD+FC)          ; Emax Modell
ENDIF
;INHIBITORISCHES SIGNAL
INH = BND
;SIGNAL-FUNKTION
SF=1/(1+ALFA*INH)

;RESPONSE KOMPARTIMENT MIT ABSOLUTEN SVEGFR2 KONZENTRATIONEN
;SIGNAL HEMMT KIN
DADT(6)= KIN*SF-KOUT*A(6)
DADT(7)= A(6)/1000

$ERROR
MC   = A(4)/VM1          ;METABOLITEN-KONZENTRATION
PC   = A(2)/V1           ;SUNITINIBKONZENTRATION
AC   = MC+PC             ;GESAMTKONZENTRATION
AUCV2 = A(7)

IPRE = A(6)
RBL  = IPRE/BLV2         ;VORHERSAGE RELATIV ZUM BASISWERT
IRES = DV-IPRE
W    = THETA(5)*IPRE    ;PROPORTIONALER FEHLER
Y    = IPRE+ERR(1)*W
DVRL = DV/BLV2         ;DV RELATIV ZUM BASISWERT

DEL = 0
IF(W.EQ.0) DEL = 1
IWRE = IRES/(W+DEL)

$ESTIMATION SIG=2 PRINT=1 METHOD=1 INTER MAXEVAL=9999 NOABORT
$COVARIANCE PRINT=E
```

## PK/PD-Modell sVEGFR-3

```
$PROBLEM sVEGFR3 CESAR C-II-005
```

```
;EINHEITEN
```

```
;Zeit - h
;Dosis - µg
;CP - ng/mL -> µg/L
;LLOQ - 0.06 ng/mL
;CL - L/h
;Volumen - L
;sVEGFR-3 - pg/mL
```

```
$INPUT ID TIME AMT DV EVID CMT CYC TYPE AGE BW HGT M1F2 KA=DROP MTTx NNx
RFPx CLx V1x Q=DROP V2=DROP CLMx VM1x VM2=DROP Q2=DROP
```

```
$DATA ...cesar_sVEGFR3_200911_SIXAM26_6pat-774.csv
;IGNORE ID19 TIME 1176 -> Wert kinetisch nicht plausibel
```

```
$ABBREVIATED COMRES=2 ;SPEICHERN VON VARIABLEN
```

```
$SUBROUTINE ADVAN6 TOL=4
```

```
$MODEL
```

```
NCOMP=8
COMP=(DEPOTD,DEFDOSE)
COMP=(CENTRAL)
COMP=(PERIPH)
COMP=(METC)
COMP=(METP)
COMP=(VEGFR3)
COMP=(AUCV3)
COMP=(TUT1)
```

```
$THETA
```

```
(0,20800) ;1 THBLV3 - BASISWERT sVEGFR-3
(0,1.58) ;2 THALFA - INTRINSISCHE AKTIVITÄT
(0,0.00453) ;3 THKOUT - KOUT
(4 FIX) ;4 THKD - DISSOZIATIONSKONSTANTE
(0,0.111) ;5 CV - PROPORTIONALER FEHLER
```

```
$OMEGA 0.187 ;1 ETA_BLV3
$OMEGA 0.332 ;2 ETA_ALFA
$OMEGA 0 FIX ;3 ETA_KOUT
$OMEGA 0 FIX ;4 ETA_KD
```

```
$SIGMA 1 FIX
```

```
$PK
```

```
"FIRST
" COMMON /PRCOMG/ IDUM1, IDUM2, IMAX, IDUM4, IDUM5
" INTEGER IDUM1, IDUM2, IMAX, IDUM4, IDUM5
" IMAX=99000000
```

```
;PHARMAKODYNAMIK
```

```
;SYSTEM-SPEZIFISCH
```

```
TVBLV3 = THETA(1)
BLV3 = TVBLV3*EXP(ETA(1))
TVALFA = THETA(2)
ALFA = TVALFA*EXP(ETA(2))
TVKOUT = THETA(3)
KOUT = TVKOUT*EXP(ETA(3))
```

```
;SUBSTANZ-SPEZIFISCH
```

```
TVKD = THETA(4)
KD = THETA(4)*EXP(ETA(4))
```

```

; PHARMAKOKINETIK
FM = 0.21
RFP = RFPx

SQ = SQRT(1+2*RFP+RFP**2-4*RFP*FM)
FFP = 0.5+0.5*RFP-0.5*SQ
FSY = FFP/RFP

FABS= 1
FD = (1-FFP)*FABS
FMAB= FABS*FM

KA = 0.54 ;TYPISCHER WERT FÜR KA
CL = CLx
V1 = V1x
V2 = 550.11 ;TYPISCHER WERT FÜR V2
Q = 0.4 ;TYPISCHER WERT FÜR Q
CLM = CLMx
VM1 = VM1x
VM2 = 683.83 ;TYPISCHER WERT FÜR VM2
Q2 = 2.39 ;TYPISCHER WERT FÜR Q2
MTT = MTTx
NN = NNx
KTR = (NN+1)/MTT

S2=V1
S3=V2
S4=VM1
S5=VM2

; DOSIERUNG
IF(NEWIND.NE.2) THEN ;RESETS TDOS UND PD FÜR JEDES INDIVIDUUM
  TDOS=26
  ON=0
  PD=0
ENDIF

; ZEIT NACH DER DOSIS
IF(AMT.GT.0) THEN
  TDOS=TIME
  ON=1
  PD=AMT*FABS
ENDIF
TAD=TIME-TDOS ;ZEIT RELATIV ZUR DOSIS

F1=0

; STERLING APPROXIMATION OF FACULTY NN Savic et al. 2007
L=LOG(2.5066)+(NN+.5)*LOG(NN)-NN

A_0(6)=BLV3
KIN=BLV3*KOUT

IF(NEWIND.LE.1) THEN
  COM(1)=BLV3
  COM(2)=-1
ENDIF

$DES
; PHARMAKOKINETIK
X=0.00001 ;VERMEIDEN LOGARITHMUS 0

; MEHRFACHDOSIERUNG
IF(T.GE.TDOS) THEN
  DADT(1)=ON*EXP(LOG(PD+X)+LOG(KTR+X)+NN*LOG(KTR*(T-TDOS)+X)-KTR*(T-TDOS)-L)-(1-FFP)*KA*A(1)-(FFP)*KA*A(1)
ELSE
  DADT(1)=ON*EXP(LOG(PD+X)+LOG(KTR+X)+NN*LOG(KTR*T+X)-KTR*T-L)-(1-FFP)*KA*A(1)-(FFP)*KA*A(1)
ENDIF

```

```

;ZENTRALES KOMPARTIMENT SUNITINIB
DADT(2)=(1-FFP)*KA*A(1)-Q/V1*A(2)+Q/V2*A(3)-CL/V1*A(2)
;PERIPHERES KOMPARTIMENT SUNITINIB
DADT(3)=Q/V1*A(2)-Q/V2*A(3)

;ZENTRALES KOMPARTIMENT SU12662
DADT(4)=FFP*KA*A(1)+CL/V1*A(2)*FSY-CLM/VM1*A(4)-Q2/VM1*A(4)+Q2/VM2*A(5)
;PERIPHERES KOMPARTIMENT SU12662
DADT(5)=Q2/VM1*A(4)-Q2/VM2*A(5)

;GESAMTE PLASMAKONZENTRATION
C = A(4)/VM1+A(2)/V1
;FREE DRUG CONCENTRATION; 95% PB SUNITINIB, 90% PB SU12662
FC= A(4)/VM1*(1-0.90)+A(2)/V1*(1-0.95)

;sVEGFR-3 - KINASE-BINDUNG
IF(FC.LE.0) THEN
  INH=0
ELSE
  INH=FC/(KD+FC)
ENDIF

;SIGNAL-FUNKTION
SF=1/(1+ALFA*INH)

;RESPONSE KOMPARTIMENT - SIGNAL HEMMT KIN
DADT(6)= KIN*SF-KOUT*A(6)

;Tmin UND Cmin ZYKLUS 1
CT=A(6)
IF(CT.LT.COM(1).AND.CYC.EQ.1) THEN ;MINIMUM CYC1
  COM(1)=CT
  COM(2)=T
ENDIF

;AUC DES BIOMARKERS ZYKLUS 1
SLP=0
IF(CYC.EQ.1) SLP=1
DADT(7)=SLP*A(6)

;ZEIT UNTERHALB EINES GRENZWERTES
RV3 =A(6)/BLV3 ;BIOMARKER-KONZENTRATION RELATIV ZUM BASISWERT
SLOPE=0
IF(CYC.EQ.1.AND.RV3.LE.0.7) SLOPE=1
DADT(8)=SLOPE

$ERROR
MC = A(4)/VM1 ;METABOLITEN-KONZENTRATION
PC = A(2)/V1 ;SUNITINIBKONZENTRATION
AC = MC+PC ;AKTIVE GESAMTKONZENTRATION

IPRE = A(6)
RBL = IPRE/BLV3 ;VORHERSAGE RELATIV ZUM BASISWERT
IRES = DV-IPRE
W = THETA(5)*IPRE ;PROPORTIONER FEHLER
Y = IPRE+ERR(1)*W
RTBL = DV/BLV3 ;DV RELATIV ZUM BASISWERT

DEL = 0
IF(W.EQ.0) DEL = 1
IWRES = IRES/(W+DEL)

CMIN1=COM(1) ;Cmin ZYKLUS 1
TMIN1=COM(2) ;Tmin ZYKLUS 1

AUCV3 =A(7)
TUT1 =A(8) ;ZEIT BIS ZUM GREUNZWERT ZYKLUS 1

$ESTIMATION SIG=2 PRINT=1 METHOD=1 INTER MAXEVAL=9999 NOABORT
$COVARIANCE PRINT=E

```

## Time-To-Event-Modell

```

$PROBLEM TIME-TO-EVENT-ANALYSIS HOLFORD CESAR C-II-005
;EINHEITEN
;Zeit      - h
;Dosis     - µg
;KD        - ngh/mL
;FAUC      - ngh/mL
;CP        - ng/mL -> µg/L
;BLTTE     - h

$INPUT ID TIME WEEK AMT DV MDV EVID CYC DOSE BTS AGE BW HGT M1F2 KA=DROP
MTTX NNX RFPX CLX V1X Q=DROP V2=DROP CLMX VM1X VM2=DROP Q2=DROP

$DATA cesar_survival_EXP_V2-280_100112VPC.csv

$SUBROUTINE ADVAN6 TOL=4

$MODEL
NCOMP=6
COMP=(DEPOTD,DEFDOSE)
COMP=(CENTRAL)
COMP=(PERIPH)
COMP=(METC)
COMP=(METP)
COMP=(CUMHAZ)

$THETA(0,0.0003) ;1 TH_BLHAZ - BASISHAZARD-FUNKTION
$THETA(-1)       ;2 TH_BETA  - FAKTOR

$OMEGA 0FIX      ;1 ETA_HAZ
$OMEGA 0FIX      ;2 ETA_BETA

$PK
" FIRST
" USE PRCOM_INT, ONLY:MITER,METH,IMAX,ISTFLG,INTFLG
" MAIN
" IMAX=200000000

;ÜBERLEBENSMODELL
;HAZARD
TVBLHAZ = THETA(1)
  BLHAZ = TVBLHAZ*EXP(ETA(1))
TVBETA  = THETA(2)
  BETA  = TVBETA*EXP(ETA(2))

;PHARMAKOKINETIK
FM = 0.21
RFP = RFPX
SQ  = SQRT(1+2*RFP+RFP**2-4*RFP*FM)
FFP = 0.5+0.5*RFP-0.5*SQ
FSY = FFP/RFP
FABS= 1
FD  = (1-FFP)*FABS
FMAB= FABS*FM

KA  = 0.54          ;TYPISCHER WERT FÜR KA
CL  = CLX
V1  = V1X
V2  = 550.11       ;TYPISCHER WERT FÜR V2
Q   = 0.4          ;TYPISCHER WERT FÜR Q
CLM = CLMX
VM1 = VM1X
VM2 = 683.83       ;TYPISCHER WERT FÜR VM2
Q2  = 2.39         ;TYPISCHER WERT FÜR Q2
MTT = MTTX
NN  = NNX
KTR = (NN+1)/MTT

```

```

S2=V1
S3=V2
S4=VM1
S5=VM2

;DOSIERUNG
IF (NEWIND.NE.2) THEN
  TDOS=0
  ON=0
  PD=0
ENDIF

;ZEIT NACH DER DOSIS
IF (AMT.GT.0) THEN
  TDOS=TIME
  ON=1
  PD=AMT*FABS
ENDIF
TAD=TIME-TDOS

F1=0

;STERLING APPROXIMATION OF FACULTY NN - FOR TRANSIT MODEL Savic et al. 2007
L=LOG(2.5066)+(NN+0.5)*LOG(NN)-NN

$DES
;PHARMAKOKINETIK
X=0.00001;VERMEIDEN LOGARITHMUS 0

;MEHRFACHDOSIERUNG
IF (T.GE.TDOS) THEN
  DADT(1)=ON*EXP(LOG(PD+X)+LOG(KTR+X)+NN*LOG(KTR*(T-TDOS)+X)-KTR*(T-TDOS)-
L)-(1-FFP)*KA*A(1)-(FFP)*KA*A(1)
ELSE
  DADT(1)=ON*EXP(LOG(PD+X)+LOG(KTR+X)+NN*LOG(KTR*T+X)-KTR*T-L)-(1-
FFP)*KA*A(1)-(FFP)*KA*A(1)
ENDIF
;ZENTRALES KOMPARTIMENT SUNITINIB
DADT(2)=(1-FFP)*KA*A(1)-Q/V1*A(2)+Q/V2*A(3)-CL/V1*A(2)
;PERIPHERES KOMPARTIMENT SUNITINIB
DADT(3)=Q/V1*A(2)-Q/V2*A(3)
;ZENTRALES KOMPARTIMENT SU12662
DADT(4)=FFP*KA*A(1)+CL/V1*A(2)*FSY-CLM/VM1*A(4)-Q2/VM1*A(4)+Q2/VM2*A(5)
;PERIPHERES KOMPARTIMENT SU12662
DADT(5)=Q2/VM1*A(4)-Q2/VM2*A(5)

;GESAMTPLASMAKONZENTRATION AN AKTIVER SUBSTANZ
C = A(4)/VM1+A(2)/V1
;UNGEBUNDENE AKTIVE KONZENTRATION 95% PB SUNITINIB, 90% PB SU12662
FC= A(4)/VM1*(1-0.90)+A(2)/V1*(1-0.95)

;ÜBERLEBENSMODELL
DADT(6)=BLHAZ*EXP(BETA*FC)

$ERROR
FRE = A(4)/VM1*(1-0.90)+A(2)/V1*(1-0.95)

CUMHAZ = A(6) ;KUMULATIVE HAZARDFUNKTION
SURV = EXP(-CUMHAZ) ;ÜBERLEBENSFUNKTION

IF (DV.EQ.1) THEN ;EVENT
  HAZNOW = BLHAZ*EXP(BETA*FRE) ;HAZARDRATE MOMENTAN
  Y = HAZNOW*SURV ;PROBABILITY DENSITY FUNCTION -
Wahrscheinlichkeit, dass das Ereignis zum gegebenen Zeitpunkt eintritt
ELSE ;ZENSIERT
  Y = SURV
ENDIF

$ESTIMATION SIG=2 SIGL=6 MAXEVAL=9999 METHOD=COND LAPLACE LIKE PRINT=1
$COVARIANCE PRINT=R

```